

重点研究支援業務成果報告書

平成12年度～平成17年度

平成18年 1月23日

国立医薬品食品衛生研究所

## 1. 統括責任者

氏名 (ふりがな) 澤田 純一  
所属・役職 機能生化学部 部長

## 2. 支援課題名：「食物アレルギー発症及びその調節メカニズムの解明並びに組換え食品の安全性評価への応用」

課題番号：H12-06

重点研究課題名①「食物アレルギー発症及びその調節メカニズムの解明並びに組換え食品の安全性評価に関する研究」

## 3. 重点研究の進捗状況

(1) 重点研究課題名「食物アレルギー発症及びその調節メカニズムの解明並びに組換え食品の安全性評価に関する研究」

①研究代表者名：澤田 純一

②研究参加者名：手島玲子 (機能生化学部・室長)、蜂須賀暁子 (機能生化学部・主任研究官)、中島治 (機能生化学部・主任研究官)、中村亮介 (機能生化学部・主任研究官)、亀山浩 (食品部・室長)、渡邊敬浩 (食品部・主任研究官)

### ③研究の概要

食物アレルギーは、そのアレルゲンとなる抗原物質が、日々栄養源として摂取しなければならぬ食品に膨大な量と種類が含まれ、また日をおって国民が摂取する食品の種類が増え、時に人類がいまだ経験したことのないものまで含まれている。そのうえ、患者の多くが消化管の免疫機能の未熟な小児に多く、症状も重篤であることが、他のアレルギー疾患とは相違した特徴である。現在までに、その発症機序として、消化吸收機能や経口免疫寛容誘導の未熟性や異常が指摘されてきたが、まだ解明されていない点が多い。このように食物由来成分のアレルゲン性を予知するためには、食物アレルギーの発症及び調節の機構の解明が必要とされる。さらに、新規食品である遺伝子組み換え食品のアレルゲン性の研究を行うためには、アレルゲン性を予知するため、既知抗原との交差反応性の検討並びに腸内分解性の検討が重要である。本研究では、食物アレルギーの克服と予防のための研究を行うことを目的とする。本年度は、①実験動物を用いた食物アレルギーのモデル系の確立と生体の反応機構の解明、②遺伝子組換え手法を用いる新規蛋白質の大腸菌での大量発現並びにアレルゲン性の検討のための分解性試験の検討③食物アレルギー患者血清中IgE抗体並びに抗原特異的IgE抗体測定系の検討、並びに食物アレルゲンデータベース構築に関する研究をあわせて行った。以下項目ごとに、概要の報告を行う。

### ③-1 食物アレルギーのモデル実験系の確立と生体の反応機構の解析

#### (1) 卵白アルブミン等の経口感作

食物のアレルゲン性を動物を用いて評価するためには、経口投与でしかもアジュバントを用いることなく感作を行うことが望ましい。しかし、経口的に投与された食物抗原は様々なメカニズムによって寛容を誘導する。そこで、寛容を誘導することなく経口感作を成立させるために、抗原の投与量や免疫継続期間などの検討が必要となる。これまでの重点研究から、BALB/c、B10A、NC/Nga、WBB6F1- W/W<sup>v</sup> マウス等にモデル抗原として卵白アルブミン (OVA) 0.1 もしくは 1.0 mg を 9 週間連日経口投与したところ、アジュバントを用いることなく抗原感作が成立し、能動的全身性アナフィラキシー(ASA)を誘導することが判明した。特に c-kit(W)遺伝子に突然変異を持つ W/W<sup>v</sup> マウス (マスト細胞欠損マウス) は他のマウス種に比べ非常に高い抗原特異的 IgG1 抗体価を示すことから、食物アレルギー動物モデルとして有用だと考えられた。さらに、W/W<sup>v</sup> マウスの小腸上皮間リンパ球(IEL: intraepithelial lymphocyte) に含まれる TCRγδ-T cell の割合が野生型マウスに比べ極端に低下していることも判明した。また、W/W<sup>v</sup> マウスの抗原提示能が高い原因の解明を目的として、TCRγδ-T cell が経口感作に及ぼす影響を調べるために、(i) W/W<sup>v</sup> マウスの野生型である WBB6F1-(+/+)マウスに抗 TCRγδ抗体を前投与後、OVA の経口感作を行い control 抗体投与群との感作の程度の比較検討を行う実験、(ii) W/W<sup>v</sup> マウスの片親にあたる C57BL/6J (Jms)

マウスの大腿骨より骨髓細胞を採取して W/W<sup>v</sup> マウスに静注し、親由来の細胞を定着させる骨髓再構成実験も行なった。その結果、W/W<sup>v</sup> マウスの経口感作能の高さは、c-kit 欠損と IEL の TCR $\gamma\delta$ -T cell の減少に関連しており、IEL の TCR $\gamma\delta$ -T cell 細胞が、経口免疫寛容に関連していることが示唆された。W/W<sup>v</sup> マウスは食物アレルギーの誘導メカニズムを検討するだけでなく、抗原感作の成立に関わる IEL TCR $\gamma\delta$ -T 細胞の役割を調べる上で、すぐれた動物モデルだと考えられた。

また、OVA 以外の抗原の感作実験から、抗原-油脂 emulsion の経口投与により、抗原単独では成し得なかった感作の成立がおこることも判明した。油脂はアジュバント様作用を持つことが示唆され、オボムコイド (OVM) の感作において、特に中鎖脂肪酸 (炭素数 8-10 の飽和脂肪酸) を多く含む油脂 (coconut oil) の方が、長鎖脂肪酸を多く含む大豆油 (soybean oil) よりもアジュバント作用の強いことが判明した。

## (2) 食物アレルギー動物モデルにおける各種食品成分や薬物投与による影響

次に、実験動物を用いた食物アレルギーのモデル系へ、食品成分や薬物がどのように作用するかを検討した。これは、食物アレルギー発症の作用機構を解析する一環として行ったものである。用いた食品成分並びに薬物は、(i) CpG-oligodeoxynucleotides-OVA (ii) リンゴポリフェノール (ACT)、(iii)  $\beta$ -カロテンである。

### (i) CpG-oligodeoxynucleotides-OVA

近年、抗原非特異的に Th1 を誘導する CpG Oligodeoxynucleotides (ODN) をアレルギー治療薬、粘膜免疫系のワクチンとして応用する研究が多機関で行われている。アレルギーの発症は Th1 と Th2 細胞のバランスが崩れて Th2 dominant に傾くからとの報告が多い。このバランスを Th1 dominant に整えることでアレルギー症状をコントロール出来る可能性がある。これまでの重点研究により、c-kit に突然変異を持つ W/W<sup>v</sup> マウスに卵白アルブミン (OVA) を強制経口投与すると他のマウス種に比べ非常に強い抗原感作が起こり、能動的全身性アナフィラキシー (ASA) を誘導することが分かっている。さらに全身免疫系は Th2 優位のヘルパー T 細胞活性条件に傾くことが分かっている。そこで、抗原非特異的に Th1 活性を誘導する CpG ODN を OVA と結合させた CpG ODN-OVA を W/W<sup>v</sup> マウスに経口投与し、抗原特異的に Th1 反応を誘導するかどうかを検討した。その結果、抗原非特異的の反応を起こす CpG ODN を抗原と結合させることで、抗原特異的に Th1 反応を誘導することが判明した。本方法は、既報の方法と異なり、感作方法として痛みなどの伴わない連続経口投与を用いて効果が得られたことから、CpG ODN の経口ワクチンとしての有用性が示唆された。

### (ii) リンゴポリフェノール (ACT)

連続経口投与で感作が誘導できる肥満細胞遺伝的欠損マウス (W/W<sup>v</sup> マウス) を用いて、ACT 経口摂取の OVA に対する経口免疫誘導に及ぼす影響及び全身免疫系へ作用する可能性について検討した。ACT は 1% の濃度で純水に溶解したものを OVA の連続経口投与開始の 1 週間前から IEL 及び脾細胞採取の日まで自由に摂取させた。その結果、TCR $\gamma\delta$ -T cell 組成比の増加を誘導することで、食物アレルギーの経口感作を抑制する可能性が示唆された。またその効果には ACT の重合度が寄与していることが示唆された。

### (iii) $\beta$ -カロテン

オボアルブミン (OVA) を腹腔内投与した BALB/c マウスへの  $\beta$  カロテン経口摂取並びに、OVA 経口投与で感作した B10A マウスへの  $\beta$  カロテン経口摂取による免疫反応への影響について検討した。 $\beta$ -カロテンが Th1 型サイトカインである IFN- $\gamma$  産生の促進により Th2 型サイトカインである IL-5 及び IL-6 産生が抑制され、感作により Th2 側へ偏向状態であった Th1/Th2 バランスを Th1 側に調節することが示唆された。また IL-12 産生も増加していることから、 $\beta$ -カロテンが抗原提示細胞に影響し、IL-12 産生を高めた結果 Th1 型へ分化を誘導することが示唆された。また IFN- $\gamma$  および IL-12 産生の促進作用は  $\beta$ -カロテンの摂取量において 0 mg/kg から 20 mg/kg まで濃度依存性があることも観察された。以上のことより、 $\beta$ -カロテンによる食物アレルギー発症抑制の作用のメカニズムの一部は  $\beta$ -カロテン経口摂取が OVA 経口感作で誘導される Th2 細胞の分化を抑制し、Th1 細胞分化を促進することにより、食物アレルギーの経口感作を抑制することになることが示唆された。

## ③-2 遺伝子組換え手法を用いる新規蛋白質等の大腸菌での大量発現並びにアレルギー性の検討のための分解性試験の検討

### (i) 新規組換えタンパク質 Cry1Ab, Cry9C, Cry3Bb1, Cry1F の大腸菌での発現

遺伝子組換え食品に導入されている新規産生タンパク質である Cry1Ab, Cry9C, Cry3Bb1, Cry1F の大腸菌での大量発現の検討を行った。遺伝子組換えトウモロコシに導入されている遺伝子配列 (Cry1Ab 遺伝子は、Bt11 とうもろこしより、Cry9C 遺伝子は、CBH351 とうもろこしよ

り、Cry3Bb1遺伝子はMon863より、Cry1F遺伝子は1507より）PCR法で単離し、大腸菌に導入することでそれぞれのタンパク質を発現することを試みた。これらタンパク質は、分解性試験並びに、ポストマーケティングを目的としたアレルギー患者血清中のIgE抗体との反応性を調べるためのELISA用の抗原として用いた。

Cry1Ab, Cry9C は、pET-23b（Novagen社）を発現ベクターとしてBL21-CodonPlus(DE3)RPstrain（Novagen社）を大腸菌宿主として利用して、大量発現に成功した。このクローンでは、10 mlの培養において約150 µgの組換えタンパクが生産されていた。この条件ではヒスチジンタグをC末端に連結させており、ニッケルを利用したキレートカラムで精製を試みた。また、pET-16bをベクターに、BL21-CodonPlus(DE3)RILstrainまたはBL21-CodonPlus(DE3)RPstrainを宿主に用いてCry1Abの発現を行うと、大量に生産されることも明らかになった。これらの場合には、インクルージョンボディとして得られるため、尿素で可溶化後、変性剤を除く必要があるなど、可溶性抗原として用いる時には、収量が低くなるという問題点があった。

そこで、Cry1Abに対して、可溶性を高めた状態で大腸菌で発現させる系として、IPTGを用いないOvernight Express Autoinduction System 1（Novagen）を試した。ベクターには、組換えタンパクにヒスチジンタグを融合させるpET-16bとpET-23b（いずれもNovagen）、GSTタグを連結させるpGEX-6P-1（アマシャムバイオサイエンス）とpET-41a（Novagen）を使用して比較を行った。培養温度を変えてみたところ20°Cで二晩培養すると、pGEX-6P-1とpET-41aを用いたときに生産される組換えタンパクのかなりの部分が水溶性になった。これは、低温で大腸菌を培養してゆっくりと組換えタンパクを生産させて、しかも水溶性の高いGSTをタグとしてCry1Abに付加させることで水溶性の組換えタンパクが発現できたと考えられた。

さらに、Cry1AbのcDNAを発現ベクターpCold-Iとシャペロン遺伝子が組み込まれた大腸菌pTf16/BL21を用いて発現させた場合に、水溶性蛋白質として更に収率よくrCry1Abを回収することができた。

Cry3Bb, Cry1Fに関しても、とうもろこしからの遺伝子配列のPCRの増幅に成功している。

従来から大腸菌を用いた蛋白質産生の技術は自然界に存在する蛋白質に対しては広く用いられているが、遺伝子組換え食品のような人工的に組み込まれた配列を単離し、大腸菌に導入して蛋白質を生産させた例は少ない。増加の一途をたどる遺伝子組換え食品の安全性の検討をする上で、食品に導入された遺伝子から産生される蛋白質を大腸菌を用いて大量精製した今回の手法は、今後とも必要であると考えられる。

#### (ii) そばアレルギーの大腸菌での発現

そばは日本のみならず、アジア地域あるいは欧米各国においても食用とされている。一方、そばアレルギー患者は日本人では鶏卵、乳製品、小麦に次いで多いので患者の診断は重要であり、その一つには皮膚試験が考えられるが、重篤なアナフィラキシーショックを引き起こすことがありうるので、できるだけ避けなければならない。よって、組換えそばアレルギーと、患者血清との反応性により診断する方法が簡便で実用的である。さらに、そばアレルギー患者は重篤なアレルギー症状を起こすことがあるのでアレルギーを同定、解析することにより、ワクチン開発などによる発作予防が可能になることも考えられる。そばアレルギーとして現在、cDNAクローニングが報告されているものとしては、24-kDa, 8-kDaの2種類が知られている。また、16-kDaアレルギー(BWp16)のcDNAクローニングはされていないものの、そば抽出物のpepsinを用いたin vitro消化実験によりpepsin分解に耐性であることから、重篤なアレルギー症状との関連が示唆されている。そこで、BWp16のcDNAクローニング、組換えタンパク質の発現・精製及び、患者血清中IgE抗体との反応性を解析した。また、食物アレルギーは一般的に経口摂取されたタンパク質が消化管において酵素分解を受けながら腸に達し、その免疫系組織に捕捉され抗原として提示されることにより成立すると云われる。したがって、食物アレルギーの抗原性には消化されやすさが深く関与する。即ち、pepsinなどの消化酵素によって分解されにくければ、アレルギーとして重篤な症状を引き起こす可能性が大きくなる。そこで、組換えBWp16のin vitro pepsin分解性試験も合わせて行った。

#### (iii) 人工胃液等による食品由来蛋白質の分解性に関する検討

食物アレルギーは、一般に経口摂取された蛋白質が消化管において酵素的分解を受けながら腸に到達し、その免疫系組織に捕捉され抗原として提示されることで成立すると言われる。

従って、食物アレルギーの抗原性には消化されやすさが深く関与する。本重点研究では、以下の3点につき、検討を行った。(a)基礎的なデータを得る目的で、各種蛋白質について同

一実験条件を用いて人工胃腸液による分解性試験を行い、消化されやすさと抗原性の関係について検討し、食物アレルゲンは一般に、人工胃液に対する消化抵抗性が高いことを確認した。また、多種のタンパク質を用いた消化性試験の国際validation試験にも参加し、遺伝子組換え食品のアレルゲン性を評価する際の消化性試験の標準的な方法の開発に寄与した。(b)消化性試験を行う際の前処理の影響について検討し、加熱前処理により、消化性が上昇することを確認した。(c)消化抵抗性を示すアレルゲンで、どの程度までの分解断片が患者血清との反応性をもっているかについて、卵白オボムコイドを用いて検討し、分子量6千の断片まで患者血清との反応性を持っていることを確認した。

### ③-3 食物アレルギー患者血清中抗原特異的IgE抗体測定系の検討、並びに食物アレルゲンデータベース構築に関する研究

#### 1) アレルゲン蛋白質とアレルギー患者血清との反応性に関する検討

アレルゲン特異的IgEが認識する抗原決定基についての知見を蓄積するため、まず日本国内における3歳児の血清を採取して(1999年から2003年の4年間)、総IgE抗体価およびアレルゲン特異的なIgE抗体価を測定し、612名分の血清について測定を終了し、特定のアレルゲンに対して高い反応性を示す血清試料の存在が確認された。食物アレルゲンには、6.7%の子供が感作されていることが判明した。また、患者血清との反応性を指標にしてアレルゲンの構造解明を高感度に解析できる手法を目指し、ヒトの血清との反応でアレルギー反応を評価できる培養細胞系を確立した。すなわち、ラット好塩基球由来RBL-2H3細胞にヒトFc $\epsilon$ RI $\alpha$ 鎖全長の遺伝子を導入し、クローニングを行って、ヒトFc $\epsilon$ RI $\alpha$ 鎖を含む高親和性IgE受容体を安定に発現する培養細胞株RBL-hE1aを樹立し、ヒトIgE抗体の受容体への結合およびそれらの架橋形成による細胞の活性化が、患者血清中のIgE濃度依存的に起きることが確認された。

遺伝子組換え食品中の新規蛋白質と食物アレルギー患者血清の反応性については、1999年から2004年度に得られた血清202件体を用い、検討を行った。抗原として、Cry1Ab, Cry9C, CP4-EPSPS, PAT タンパク質を用い、ELISA法にて検討を行ったが、これらタンパク質に対するIgE抗体が陽性となる事例は、観察されなかった。

また、精製した新規産生蛋白質のみでなく、遺伝子組換え体において、非組換え体の場合と患者血清との反応性の異なるタンパク質の存在する可能性についても検討するため、従来のトウモロコシ(non-GM-corn)とCry1Abを発現させたトウモロコシ(GM-corn)抽出物に対するとうもろこしアレルギー患者血清の反応性をウエスタンブロット法で検出を行った。さらに、大豆についても従来の大豆(non-GM-soybean)とCP4-EPSPSを発現させた大豆(GM-soybean)をそれぞれ抗原として大豆患者血清によるIgE-ウエスタンブロットを行ない、non-GMとGM大豆での反応性の比較検討を行ったが、いずれの場合もnon-GMとGM作物抽出物と患者血清との反応性において、違いはみられなかった。

#### 2) アレルゲンデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)の作成

遺伝子やタンパク質の一次配列に関するデータベースは、日米欧において必要十分な機能を持つものが複数構築されているが、アレルゲンに関する情報を集め解析する有用なデータベースは、未だ確立されていない。そこで本研究では、我々は、アレルゲンに関する情報を集めて解析するための新規データベース、Allergen Database for Food Safety (ADFS)を構築し、web上で2005年4月に公開した(URL: <http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>)。本データベースはアレルゲンに関する既存の各種データベースや一次文献の情報を集積し、アレルゲン名・カテゴリ(花粉・ダニ・動物・カビ・昆虫・食物・ラテックス・その他)・キーワード(動物種・一般名等)・アミノ酸配列等により検索可能な新規統合型アレルゲンデータベースであり、アレルゲンの交差反応を考える上で非常に重要となるエピトープ情報および立体構造情報(PDBエントリ)も付加している。また、このデータベースは、FAO/WHOが提唱するタンパク質のアレルゲン性予測インターフェイスを有しており、解析ツールとしても利用することができる。現在、ADFSを更に充実したものとするため、アレルゲン情報の拡充・更新、エピトープ配列情報の追加、3次元エピトープ情報をもつ論文へのリンク、など新たな情報の追加を行なうとともに、タンパク質のアレルゲン性予測機能については、FAO/WHO法としての改変Hileman法に加えて、Stadlerらの motif-based prediction を利用できるよ

うにし、2006年1月にアップデート版をweb上に公開する予定である。本データベースは、エピトープ情報としては、世界で最高の数を網羅しており、タンパク質のアレルゲン性の予測に広く使われることが期待される。

#### ④研究の成果

##### ④-1食物アレルギーのモデル実験系の確立

###### (1) 卵白アルブミン等の経口感作

具体的には、アトピー性皮膚炎を発症しやすいNC/Nga Tnd Crj (NC/Nga) マウス (7週令、メス)、W(c-kit)遺伝子座突然変異によるc-kitの発現欠失のためマスト細胞を欠損しているWBB6F<sub>1</sub>-W/W<sup>v</sup> (W/W<sup>v</sup>) マウス (7週令、メス) の各群に卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) を、0.1mg, 1mg/マウス連日強制経口投与し、4-9週間免疫した。対照群には生理食塩水を投与した。免疫の進行は、眼底より部分採血して検討し、最終免疫後7日目に全採血を行い、抗原特異的IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b, 及びIgA抗体価の測定は、OVAを固相抗原とした間接ELISA法にて行った。能動性全身性アナフィラキシーショック (ASA) は、抗原を腹腔内投与して誘導し、直腸の体温変化を経時的にモニターした。血液中ヒスタミン濃度の測定は、ASA誘導後のマウス血清を用い、ポストカラム化HPLC法にて行った。また、W/W<sup>v</sup>マウスに関しては、ASA誘導後の血液中PAF濃度を、血漿の脂肪酸画分のPAF放射免疫測定 (RIA) を行うことにより測定した。なお、ASA誘導30分前にPAF拮抗薬 (BN52021) (10mg/kg) を腹腔内投与し、ASA反応への影響を調べた。さらに、脾臓細胞のサイトカイン産生に関しては、摘出した感作動物の脾臓から細胞を調整し、24穴プレートの各穴に5 x 10<sup>6</sup> cells/mLの濃度で細胞を分注し、OVA (100µg/mL) 共存下37°C, 3日間培養し、培養上清中に含まれるIL-4及びIFN-γ濃度をELISAキットを用いて測定した。W/W<sup>v</sup>マウス、NC/Ngaマウスにおいても、連日のOVAの経口感作により、Th2タイプ優位の抗原特異的抗体産生がみられ、IgE, IgG1, IgA抗体産生を促す濃度として、W/W<sup>v</sup>マウスでは、1mg /匹/day, 0.1mg/匹/dayで大差ないが、NC/Ngaマウスに関しては、1mgOVA/匹/dayの方が高い産生能を示した。また、IgG2a及びIgG2b抗体価の上昇は両マウスともみられなかった。またW/W<sup>v</sup>マウスは、NC/Ngaマウス (titer=4300) と比べ非常に高いIgG1抗体産生能を有しており (titer=45000)、腸管粘膜免疫系での抗原提示能のことが予想された。ASA反応に伴う体温低下は、W/W<sup>v</sup>マウスは、NC/Ngaマウス共にみられた。ASA誘導後の、血液中ヒスタミン濃度の測定に関しては、NC/Ngaマウス1.0 mg OVA経口感作群において、高濃度のヒスタミン(0.9 µM)が検出された。W/Wマウスでは、血液中ヒスタミンは検出されなかったが、1.0 mg OVA投与群では対照群と比べ、ASA後の血液中PAF濃度の有意な(約2倍)の上昇が観察され、PAF拮抗薬の前投与によるASA反応に伴う体温低下の抑制もみられたことより、PAFが、ASA誘発物質の一翼を担っている可能性が示された。さらに、サイトカインの産生に関しては、W/W<sup>v</sup>及びNC/Nga両マウスの抗原感作群においてIL-4産生増加傾向が見られ、特に1 mg OVA投与群がより顕著な値を示した。一方、IFN-γ産生は低くなる傾向が見られた。この結果から、OVAの経口感作により、IL-4などのサイトカイン産生能を持つTh2優位のヘルパーT細胞の活性化が優位に引き起こされることが示唆された。

次いで、マウスに食物抗原を経口投与するに際し、溶媒を生理食塩水から油脂に換えた場合の感作への影響について検討した。マウスは、W/W<sup>v</sup>マウス及びBALB/cマウスを用い、抗原はオボムコイド(OVM)溶液と大豆油、ヤシ油のエマルジョンを作成し経口投与を行った。

具体的には、下記の方法で研究を行った。油脂として、長鎖脂肪酸を多く含む大豆油 (soybean oil) と中鎖脂肪酸 (炭素数8-10の飽和脂肪酸) を多く含むヤシ油 (coconut oil) の2種類の油脂を選択したが、これら油脂に等量のOVM/saline (20 mg/mL) を加え、超音波処理 (5分を3回) 後、マウス一匹につき100 µL (1.0 mg OVM) を経口投与することとした (water : oil = 1 : 1)。W/W<sup>v</sup>及びBALB/cマウス (7週令、雌) をそれぞれ7匹ずつ6群に分け、OVM-W/O emulsion (soybeanまたはcoconut oil) を9週間連日強制経口投与した。対照群には生理食塩水またはそれぞれの油脂を投与した。投与開始より4及び9週間後に眼底採血をして血清を採取し、ELISA法を用いて血清中抗原特異的 IgG1, IgE, 及びIgA抗体価測定を行い感作の成立を確認した。9週間後に抗原の腹腔内投与 (1 mg) により能動的全身性アナフィラキシー (ASA) を誘導し、直腸の体温変化を1分毎10分間経時的に測定した。その後、全採血をしてBALB/cマウスに関しては血清中ヒスタミン濃度をポストカラムHPLC法により測定した。さらに脾臓を摘出し、5 x 10<sup>6</sup> cells/mLの脾臓細胞をOVM共存下 (100 µg/mL) 24穴プレート上で37 °C、72時間培養し、培養上清中に含まれるサイトカイン (IL-4, IL-5, IL-10, IL-2, 及びIFN-γ) 濃度をELISAキットを用いて測定した。又、小腸よりパイエル板及び小腸上皮細胞間リンパ球

(IELs) を分離採取し、フローサイトメトリー (FCM) によりリンパ球サブセット解析を行った。

結果として、BALB/cマウスへのOVM-W/O emulsionの9週間連日経口投与により、それぞれの対照群に比べ血清中抗原特異的IgG1抗体価の上昇傾向が見られた (OVM-soybean oilでは4匹/7匹(titer(抗体価)=4948±12249)、OVM-coconut oilでは5匹/7匹(titer=10959±19347))。しかし、いずれも個体差が大きく有意差が出るまでには至らなかった。これに対しOVM単独投与群では全く変化が見られていない (0匹/6匹)( $<50$ )。また、抗原特異的IgE抗体価はOVM-coconut oil投与群で一匹のみ顕著に上昇したが、他のマウスでは大きな変化が認められなかった。W/W<sup>v</sup>マウスでは、IgG1抗体価の有意な上昇が見られ(OVM-soybean oilでは6匹/7匹(titer=18520±21124)、OVM-coconut oilでは7匹/7匹(titer=14295±15794))、IgE抗体価も上昇した。これに対しOVM単独投与群では全く変化が見られていない (0匹/6匹) ( $<50$ )。emulsion感作群の抗体価を見ると、BALB/cマウスに比べW/W<sup>v</sup>マウスで顕著に上昇しており、W/W<sup>v</sup>マウスの経口感作による高感受性を確認出来た。

脾臓細胞から産生されるサイトカイン濃度の測定においては、OVM-W/O emulsionを投与したBALB/cマウスで、Th2型サイトカイン(IL-4、IL-5)の産生上昇が見られ、特にOVM-coconut oil投与群で顕著だった。また、Th1型サイトカインのうちIL-2には変化が認められなかったが、IFN- $\gamma$  の濃度がOVM単独投与群に比べ上昇していた。一方、OVM単独投与群では対照群と同様に大きな変化は見られなかった。またW/W<sup>v</sup>マウスでは、emulsion投与群でTh2型サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-10) の産生上昇が見られた。IFN- $\gamma$  の濃度もそれぞれの対照群に比べ上昇していた。対して、OVM単独投与群では対照群と同様に大きな変化は見られなかった。BALB/cマウス、及びW/W<sup>v</sup>マウスのemulsion投与群でTh1、特にTh2型サイトカインの濃度上昇が見られたことから、油脂はアジュバント様作用を持つことが示唆された。

次に、経口投与後にBALB/cマウスへ抗原の腹腔内惹起をしたところ、OVM-W/O emulsion投与群で急激な体温低下が見られた。これに対しOVM単独投与群では対照群と同様に大きな変化が見られず、ASAの誘導は起こらなかった。さらに抗原の腹腔内惹起をして10分後、全採血して血清中ヒスタミン濃度を測定したところ、個体差はあるがOVM-W/O emulsion投与群で顕著な濃度上昇が見られ、ここでもASAの誘導が確認された。W/W<sup>v</sup>マウスでも同様に、emulsion投与群で有意な体温低下が見られ、ASAの誘導が認められた。

マウスの腸管、十二指腸から回腸までを切り出しパイエル板、及びIELsを分離精製してFCMにより各臓器のリンパ球サブセット構成を調べたところ、BALB/cマウスの脾臓細胞では抗原投与群と対照群の間に大きな変化は認められなかった。W/W<sup>v</sup>マウスでは、OVM-W/O emulsion投与群でB細胞の割合が減少し、T細胞の増加が見られた。同様にW/W<sup>v</sup>マウスのFCM解析を行ったところ、OVM-coconut oil投与群のパイエル板でIA<sup>b</sup>+細胞の割合が上昇傾向にあった。さらにIELsでは、対照群に比べOVM-W/O emulsion投与群でTCR $\alpha\beta$ CD4+T細胞の割合が減少した。これに対して腸管に特異的なCD8 $\alpha\alpha$ +T細胞が上昇傾向を示し、抗原投与によりT細胞のサブポピュレーションに変化が起こることが分かった。

以上のことから、抗原-油脂 emulsionの経口投与により、抗原単独では成し得なかった感作の成立がおこること、W/W<sup>v</sup>マウスに比べ経口感作が難しいBALB/cマウスにおいても、抗原-油脂 emulsionであれば感作が成立することが分かった。さらに、油脂はアジュバント様作用を持つことが示唆され、今回の実験では特に中鎖脂肪酸 (炭素数8-10の飽和脂肪酸) を多く含む油脂(coconut oil)でその作用が強い傾向にあると思われた (BALB/cマウス)。

## (2) 食物アレルギー動物モデルにおける各種食品成分や薬物投与による影響

### (i) CpG-oligodeoxynucleotides-OVA

まず、W/W<sup>v</sup>マウスに4週間連日0.1 mg OVAまたはCpG ODN-OVAを経口投与した。感作の成立は投与3週目、5週目に眼底採血をして血清を採取し、ELISA法を用いて血清中抗原特異的IgG1、IgE、IgG2a抗体価で確認した。経口投与後に抗原の腹腔内投与(1 mg)により能動的全身性アナフィラキシー(ASA)を誘導し、直腸の体温変化を1分毎10分間経時的に測定した。また、感作動物の脾臓を摘出し、 $5 \times 10^6$  cells/mLの脾臓細胞をOVM共存下(100  $\mu$ g/mL)24穴プレート上で37°C、72時間培養し、培養上清中に含まれるサイトカイン(IL-4、IL-5、及びIFN- $\gamma$ )濃度をELISAキットを用いて測定した。

その結果、OVA単独投与群ではcontrol群に比べ、OVA特異的IgG1抗体価の有意な上昇が見られ(titer=1160±683)、IgE抗体価も上昇傾向にあった。対して、CpG ODN-OVA投与群ではIgG2a抗体価の上昇傾向が見られたが、IgG1抗体価はOVA単独投与群に比べ抑えられていた。また、経口感作後に1.0 mg OVAの抗原腹腔内惹起(全身性免疫)を行い、1分毎に10分間体

温変化を測定したところ、OVA単独投与群及びnon-CpG ODN-OVA投与群で急激な体温低下が見られ、ASAの誘導が認められた。これに対してCpG ODN-OVA投与群ではcontrol群同様、大きな体温低下が認められず、ASAの誘導は起こらなかった。さらに、100 µg OVA存在下で脾臓細胞を培養しその上清中のサイトカイン濃度を測定したところ、OVA単独投与群及びnon-CpG ODN-OVA投与群でTh2 typeサイトカイン (IL-4) の有意な濃度上昇が見られた。一方、CpG ODN-OVA投与群ではTh1 typeのサイトカイン、IFN- $\gamma$  の有意な濃度上昇を示したことから、Th1優位のヘルパーT細胞の活性化が引き起こされたことが示唆された。

以上のことから、今回、抗原非特異的応答を起こすCpG ODN を抗原と結合させることで、抗原特異的にTh1 反応を誘導することに成功した。しかも既報の方法と異なり、感作方法として痛みなどの伴わない連続経口投与を用いて効果が得られたことから、CpG ODN の経口ワクチンとしての有用性が示唆された。

#### (ii) リンゴポリフェノール (ACT)

9週齢の雌性W/W<sup>m</sup>マウスに卵白アルブミン (OVA) 1 mg/匹を9週間連日経口投与し、9週後に全採血を行い血清中OVA特異的抗体価 (IgE, IgG1 及びIgG2a) を測定した。ACTは1%の濃度で純水に溶解したものをOVAの連続経口投与開始の1週間前からIEL及び脾細胞採取の日まで自由に摂取させた。対照群には純水を投与させた。9週間後脾臓を摘出して細胞懸濁液 (5.0×10<sup>6</sup> cells/ml) を調製し、培養プレートに分注し、*in vitro*において卵白アルブミン (OVA) を最終濃度100 ppmとなるよう添加して、培養温度37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%の条件下で3日間培養し、脾細胞より産生された培養上清中のサイトカイン (IL-5, IL-6, IL-12, IL-2及びIFN- $\gamma$ ) 濃度をELISAで定量した。対照群には生理食塩水を添加した。さらに、小腸から腸管上皮細胞間リンパ球 (IEL) を分離精製し、フローサイトメトリー (FCM) による表面抗原解析、血清中抗体価とマウスから摘出した脾臓由来の培養脾細胞から産生される各種サイトカインを指標に腸管免疫系を介した全身免疫系に及ぼす影響について検討した。雌性W/W<sup>m</sup>マウス (6週齢) に1%濃度で水に溶解して調整した培養温度37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%の条件で培養し、3日、7日後に培養液を回収し各種サイトカイン産生をELISA法により測定した。脾臓T細胞などの全身免疫系T細胞が $\alpha\beta$ T細胞レセプター (TCR $\alpha\beta$ ) を発現し、CD4、CD8分子の発現により2つのサブセット (TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) に分類されるのに対し、腸管上皮内リンパ球 (IEL) はTCR $\gamma\delta$ 陽性細胞が約半分を占め、CD4、CD8 $\alpha$ 鎖、CD8 $\beta$ 鎖の発現とあわせて5つのサブセット (TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>) に分類される。これらのサブセットの割合に対するACT経口投与による影響を検討した。

その結果、OVA の 9 週間連日経口投与により、血清中 OVA 特異的抗体価において ACT 自由摂取群は対照群に比べて血清中 OVA 特異的 IgE 抗体価、IgG1 抗体価及び IgG2a 抗体価がすべて低い傾向がみられた。IgE 抗体価減少の影響に関しては、ACT 経口摂取の濃度依存性が観察された。また、培養脾臓細胞から産生されるサイトカイン濃度を測定したところ、ACT 摂取群は対照群と比べ IL-2、IL-12 及び IFN- $\gamma$  産生には大きな変化がみられなかったが、IL-5 及び IL-6、IL-10 産生は抑制された。このことから ACT 摂取は OVA の経口感作を抑制することが示唆された。腸管上皮内リンパ球 (IEL) のサブセット解析においては、ACT 摂取群は対照群と比べ TCR $\gamma\delta$  陽性細胞組成比の有意な増加が認められた。以上のことから、ACT は経口感作誘導による TCR $\gamma\delta$ -Tcell の減少を抑制するとことにより、経口感作を抑制し、経口免疫寛容を誘導する可能性が示唆された。

これまでの実験において、リンゴポリフェノールの主要活性成分と考えられている ACT の 2 量体は、マウスに経口摂取した場合、血中への移行はほとんどみられなかったことから、未代謝物としての状態では吸収が困難であると思われた。そこで腸管免疫系を介した全身免疫系への影響を検討した。血清中 OVA 特異的抗体価において、ACT 摂取群は対照群に比べて血清中 OVA 特異的 IgE 抗体価と IgG1 抗体価および IgG2a 抗体価が有意に低かったことから、ACT が OVA の経口感作を抑制することが示唆された。またその IgE 抗体産生減少に関して ACT 経口摂取の濃度依存性が観察された。また、サイトカイン濃度を測定したところ、ACT 摂取群は対照群と比べ IL-2、IL-12 及び IFN- $\gamma$  産生には影響なかったが、IL-5 及び IL-6 産生は抑制された。このことから Th2 型の分化が抑制されていることが示唆された。この結果も OVA による経口感作の抑制に関連していると考えられる。IEL のサブセット解析においては、ACT 摂取群は対照群と比べ TCR $\gamma\delta$  陽性細胞組成比の有意な増加が認められた。以上のことから、ACT は経口感作誘導による TCR $\gamma\delta$ -Tcell の減少を抑制するとことにより、経口感作を抑制し、経口免疫寛容を誘導する可能性が示唆された。

#### (iii) $\beta$ -カロテン

6週令雌BALB/cマウスにOVAを水酸化アルミニウムゲルと共に腹腔内投与 (1次免疫) し、10

日後に同様に投与（2次免疫）を施した。2次免疫から1週間後に血清中OVA特異的抗体価（IgE, IgG<sub>1</sub>及びIgG<sub>2a</sub>）を測定した。その後、10 µg/mL OVA 200 µLを腹腔内投与して、能動的全身性アナフィラキシーショック（ASA）を誘導し、1分毎に体温を測定した。次いで惹起後7分で全採血を行い、血清中ヒスタミン濃度測定を行った。また脾細胞懸濁液（5×10<sup>6</sup> cells/mL）を調製後、100 µg OVA/well共存下、37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%の条件下で3日間培養し、脾細胞より産生された培養上清中のサイトカイン濃度をELISAで測定した。さらに脾細胞懸濁液からRNAを精製し、RT後、Real-time PCR法によりIFN-γのmRNAを定量的に分析した。β-カロテンの吸収の指標として、肝臓中β-カロテン量をHPLCで測定した。β-カロテンはMF粉末飼料に混合（20 mg/kg）して、1次免疫の2週間前から約1ヶ月自由摂取させた。実験は全て雌性BALB/cマウス6週齢を用い、1週間以上国立医薬品食品衛生研究所動物舎において予備飼育した後、実験に供した。予備飼育から実験中を通して、23 ± 2°C、湿度55 ± 5%に保たれたSPF環境下のチップゲージで飼育し、食餌（CRF-1、オリエンタル酵母）、飲水は全て自由摂取とした。

飼料中のβ-カロテンの安定性を検討するために、HPLCで分析した結果、実験期間中における飼料中のβ-カロテン量には変動がなかった。また、β-カロテン投与群においては、対照群に比べ肝臓中のβ-カロテン量が高値をしめしたことから、β-カロテン投与群は有意にβ-カロテンが吸収されていることが判明した。また実験期間中における両群における体重増加、飼料摂取量において有意な差はみられなかった。血清中OVA特異的IgE抗体価およびIgG<sub>1</sub>抗体価において、β-カロテン摂取群は対照群に比べて有意に低かった。一方IgG<sub>2a</sub>抗体価において、β-カロテン摂取群は対照群に比べ、有意に高値であった。ASA誘導後、β-カロテン摂取群では対照群と比較して、体温低下率及び血清中ヒスタミン濃度が有意に低値であった。脾細胞採取後のIFN-γのmRNA量はβ-カロテン摂取群が対照群に比べ、有意に増加していた。またOVA共存下で培養した脾細胞より産生されたサイトカイン量を測定したところ、β-カロテン摂取によってTh1型サイトカインであるIFN-γ産生は有意に促進され、Th2型サイトカインであるIL-4、IL-5等の産生は有意に抑制された。以上の結果より、β-カロテン摂取は、免疫感作によりTh2側にシフトしたTh1/Th2バランスをTh1側へ調節にすることで、即時型アレルギー反応を抑制することが示唆された。

CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞（Th）には、サイトカイン産生パターンによりTh1とTh2の2種類のタイプが存在し、それぞれが感染症とアレルギーに関与していると考えられている。Th1、Th2細胞は互いに抑制しあい、これらの細胞によって形成されるTh1/Th2バランスは免疫制御の中核として位置づけられている。OVA免疫感作マウスにβ-カロテン経口摂取し、β-カロテンが腸管免疫系を介して全身免疫系へ作用する可能性を検討した実験の結果、β-カロテンがTh1型サイトカインであるIFN-γ産生の促進によりTh2型サイトカインであるIL-5及びIL-10産生が抑制され、感作によりTh2偏向の状態にあるTh1/Th2バランスをTh1に調節することが示唆された。培養7日目にIL-5及びIL-10産生の有意な抑制が示したのは、培養3日目に増加したIFN-γがT細胞間の情報伝達として機能する際の時間的なずれが生じたためであると考えられる。またIL-12産生も増加していることから、β-カロテンが抗原提示細胞に影響し、IL-12産生を高めた結果Th1型へ分化を誘導することが示唆された。またIFN-γおよびIL-12産生の促進作用はβ-カロテンの摂取量において0 mg/kgから20 mg/Kgまで濃度依存性があることが観察された。よって期待された効果はβ-カロテン摂取量と相関があることが示唆された。

6週令雌BALB/cマウスにOVAを水酸化アルミニウムゲルと共に腹腔内投与（1次免疫）し、10日後に同様に投与（2次免疫）を施した。2次免疫から1週間後に血清中OVA特異的抗体価（IgE, IgG<sub>1</sub>及びIgG<sub>2a</sub>）を測定した。その後、10 µg/mL OVA 200 µLを腹腔内投与して、能動的全身性アナフィラキシーショック（ASA）を誘導し、1分毎に体温を測定した。次いで惹起後7分で全採血を行い、血清中ヒスタミン濃度測定を行った。また脾細胞懸濁液（5×10<sup>6</sup> cells/mL）を調製後、100 µg OVA/well共存下、37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%の条件下で3日間培養し、脾細胞より産生された培養上清中のサイトカイン濃度をELISAで測定した。さらに脾細胞懸濁液からRNAを精製し、RT後、Real-time PCR法によりIFN-γのmRNAを定量的に分析した。β-カロテンの吸収の指標として、肝臓中β-カロテン量をHPLCで測定した。β-カロテンはMF粉末飼料に混合（20 mg/kg）して、1次免疫の2週間前から約1ヶ月自由摂取させた。実験は全て雌性BALB/cマウス6週齢を用い、1週間以上国立医薬品食品衛生研究所動物舎において予備飼育した後、実験に供した。予備飼育から実験中を通して、23 ± 2°C、湿度55 ± 5%に保たれたSPF環境下のチップゲージで飼育し、食餌（CRF-1、オリエンタル酵母）、飲水は全て自由摂取とした。

飼料中のβ-カロテンの安定性を検討するために、HPLC で分析した結果、実験期間中における飼料中のβ-カロテン量には変動がなかった。また、β-カロテン投与群においては、対照群に比べ肝臓中のβ-カロテン量が高値をしめたことから、β-カロテン投与群は有意にβ-カロテンが吸収されていることが判明した。また実験期間中における両群における体重増加、飼料摂取量において有意な差はみられなかった。血清中 OVA 特異的 IgE 抗体価および IgG<sub>1</sub> 抗体価において、β-カロテン摂取群は対照群に比べて有意に低かった。一方 IgG<sub>2a</sub> 抗体価において、β-カロテン摂取群は対照群に比べ、有意に高値であった。ASA 誘導後、β-カロテン摂取群では対照群と比較して、体温低下率及び血清中ヒスタミン濃度が有意に低値であった。脾細胞採取後の IFN-γ の mRNA 量はβ-カロテン摂取群が対照群に比べ、有意に増加していた。また OVA 共存下で培養した脾細胞より産生されたサイトカイン量を測定したところ、β-カロテン摂取によって Th1 型サイトカインである IFN-γ 産生は有意に促進され、Th2 型サイトカインである IL-4、IL-5 等の産生は有意に抑制された。以上の結果より、β-カロテン摂取は、免疫感作により Th2 側にシフトした Th1/Th2 バランスを Th1 側へ調節にすることで、即時型アレルギー反応を抑制することが示唆された。

CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞 (Th) には、サイトカイン産生パターンにより Th1 と Th2 の2種類のタイプが存在し、それぞれが感染症とアレルギーに関与していると考えられている。Th1、Th2 細胞は互いに抑制しあい、これらの細胞によって形成される Th1/Th2 バランスは免疫制御の中核として位置づけられている。OVA 免疫感作マウスにβ-カロテン経口摂取し、β-カロテンが腸管免疫系を介して全身免疫系へ作用する可能性を検討した実験の結果、β-カロテンが Th1 型サイトカインである IFN-γ 産生の促進により Th2 型サイトカインである IL-5 及び IL-10 産生が抑制され、感作により Th2 偏向の状態にある Th1/Th2 バランスを Th1 に調節することが示唆された。培養7日目に IL-5 及び IL-10 産生の有意な抑制が示したのは、培養3日目に増加した IFN-γ が T 細胞間の情報伝達として機能する際の時間的なずれが生じたためであると考えられる。また IL-12 産生も増加していることから、β-カロテンが抗原提示細胞に影響し、IL-12 産生を高めた結果 Th1 型へ分化を誘導することが示唆された。また IFN-γ および IL-12 産生の促進作用はβ-カロテンの摂取量において 0 mg/kg から 20 mg/Kg まで濃度依存性があることが観察された。よって期待された効果はβ-カロテン摂取量と相関があることが示唆された。

④-2 遺伝子組換え手法を用いる新規蛋白質の大腸菌での大量発現並びにアレルギー性の検討のための分解性試験の検討

(i)新規組換えタンパク質Cry1Ab, Cry9C, Cry3Bb1, Cry1Fの大腸菌での発現

Cry1Abの大腸菌での発現法について以下に記述する。ベクターにpET-16b (Novagen)、ホストにBL21-CodonPlus (DE3) RIL (Stratagene) を用いた条件で以下の検討を進めた。1 mM IPTGを使用して発現を誘導すると、組換えCryIAbを大量に発現させることに成功した。また、この組換えタンパクはインクルージョンボディとして生産されていることが分かった。医学生物学研究所に組換えCryIAbの精製、リフォールディングおよびポリクローナル抗体の調製を依頼した。リフォールディングの進行状況を調べてみると、組換えCryIAbは1 M尿素の存在下では溶解しているが、1 M以下に尿素の濃度を下げると沈殿してしまい、完全にリフォールディングさせることができなかった。そこで1 M尿素の存在下で組換えCryIAbの精製を進めた。第1段階目のキレートカラムを用いた精製では純度が十分に高くならなかった。さらにゲルろ過担体Sephadex G-75と 2-メルカプトエタノールを含むバッファーを用いて精製した。しかし、35 kDaの混入タンパクを除去することができなかった。そこで、精製法を変えて、SDS-PAGEで大腸菌のタンパクを分離して、スラブゲルから組換えCryIAbを抽出した。正しく組換えCryIAbが回収できたことは抗ヒスチジンタグ抗体によるイムノブロッティングによって確認した。これを抗原として使用して、ウサギに免疫してポリクローナル抗体を調製した。

上記の方法で得られた組換えCryIAbはSDSを含むバッファー中に存在しており、変性状態であると推定される。ところで、ELISAのコーティング抗原は直線状のエピトープを認識する抗体のみならず、コンフォーメーションを認識する抗体も合わせて検出できることが望ましい。つまり変性状態の組換えタンパクをコーティング抗原として使用するのはいさぎよく好ましくないとされる。上述のように、組換えCryIAbについてはリフォールディングを行うことが困難だったので、水溶性のタンパクとして発現させる条件を詳細に探した。IPTGを使用して組換えタンパクの発現誘導を行わない方法として、最近登場したOvernight Express Autoinduction System 1 (Novagen) を試してみた。ベクターには、組換えタンパクにヒスチジンタグを融合させるpET-16bとpET-23b (いずれもNovagen)、GSTタグを連結させるpGEX-6P-

1 (アマシヤムバイオサイエンス) と pET-41a (Novagen) を使用して比較を行った。培養温度を変えてみたところ 20°C で二晩培養すると、pGEX-6P-1 と pET-41a を用いたときに生産される組換えタンパクのかなりの部分が水溶性になった。これは、低温で大腸菌を培養してゆっくりと組換えタンパクを生産させて、しかも水溶性の高い GST をタグとして CryIA b に付加させることで水溶性の組換えタンパクが発現できた。さらに、シャペロンを大量発現する大腸菌 pTf16/BL21 をホストとして用い、ベクターとして pCold 1 を選択した場合に水溶性 Cry1Ab の回収が良好となった。

なお、Cry3Bb1 cDNA 及び Cry1F cDNA のクローニングは、次のように行った。すなわち、MON863, 1507 から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) によりゲノム DNA を抽出し、各ゲノム DNA を鋳型として、Cry3Bb1 の全長 cDNA 領域 (634 アミノ酸残基, 1962 bp) あるいは Cry1F の N 末側 603 アミノ酸残基をコードする cDNA (1809 bp) を KOD plus により PCR 増幅し、増幅産物は A-tailing、pT7-Blue-T vector に連結後 DH5 $\alpha$  に形質転換、plasmid 抽出、DNA 塩基配列の決定を行なった。

(ii) そばアレルゲンの大腸菌での発現

(a) 新規組換えそば 16-kDa アレルゲンタンパク質 (BWp16) の cDNA クローニング

福井産そばの実から Sepazol RNA isolation kit (Nakarai Tesc) により、RNA を抽出した。ゲノム DNA のコンタミネーションを防ぐために RNase free DNase I (TAKARA) 処理を行なった。そばの実一粒あたり、約 3  $\mu$ g の total RNA が得られた。cDNA 合成は SMART RACE Kit (BD Bioscience) で常法通り行なった。5'-RACE PCR は UPM (universal primer mix) と p16-R3-5'-RACE primer (塩基番号 66-41)、3'-RACE PCR は 1st PCR が p16-F1-3'-RACE primer (塩基番号 15-39) と UPM, nested PCR が p16-F2-3'-RACE primer (塩基番号 193-217) と nested universal primer を用いてそれぞれ行なった。PCR 条件は Touchdown PCR で行なった。各 PCR 産物は A-tailing、pT7-Blue-T vector (Novagen) に連結、大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転換、plasmid 抽出を行い、ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) によるサイクルシークエンス反応、DyeEx96 kit (Qiagen) による未反応物の除去、ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) による塩基配列の決定をおこなった。さらに 5'-RACE 及び 3'-RACE クローンの塩基配列を基に、コーディング領域の全長 cDNA をクローニングした。

得られた BWp16 cDNA は全長 645 塩基対で、149 アミノ酸をコードする open reading frame を有し、タンパク質の予想分子量は 16.9 kDa であった。Basic local alignment search tool (BLAST) によるホモロジー検索により BWp16 は、そば 8-kDa アレルゲン (Genbank accession number: AB055892) と アミノ酸配列で 54.1%、トウゴマ 2S アルブミン (Genbank accession number: 1707274A) と 28.2% の相同性が見られた。この結果から、BWp16 は多くの植物のアレルゲンとして同定されている 2S アルブミンファミリーに属することが示された。次に 2S アルブミンファミリータンパク質は N 末端側にシグナル配列を有しているため、BWp16 にシグナル配列が存在する可能性を SignalP 3.0 Server で調べた。その結果、92.8% の信頼度で BWp16 の N 末端側にシグナル配列が存在するという結果を得た。また 3'-非翻訳領域にはストップコドン、poly(A) 及び poly(A) 付加シグナルが存在し、poly(A) の前には U-rich 領域が存在するので、BWp16 cDNA は 5'-及び 3'-完全長 cDNA を保持していると考えられた。

(b) 組換え BWp16 タンパク質の大腸菌での発現及び精製

まず、成熟 BWp16 タンパク質の N 末配列から stop codon (アミノ酸番号 23-149) までの領域の cDNA を KOD plus (TAKARA) により PCR 増幅し、BamHI と EcoRI で制限酵素処理を行ない、GST 融合タンパク質発現ベクターである pGEX-6P-1 (Amersham Biosci.) に連結した。塩基配列の決定及び確認は (1) で述べた手法と同様に行なった。得られた発現ベクターは大腸菌 BL21(DE3)pLysS に形質転換した。次に、GST-BWp16 の発現検討をおこなった結果、IPTG 濃度: 0.2 mM, 誘導時間: 4 時間, 培養温度: 25 °C で可溶性タンパク質の誘導が最良であった。続いて、200 ml の LB 培地で発現誘導を行い、可溶性画分を Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosci.) に結合させ、cleavage buf. (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) 中で PreScission Protease (Amersham Biosci.) により GST 部分を切り離し、BWp16 を精製した。精製した組換え BWp16 は 16% SDS-PAGE で分

離し、CBB染色を行なった。タンパク質定量はBCA protein assay (Pierce Biotechnology Inc.)を用いて行なった。

この結果、200 mlのLB培地あたり約1 mgの精製BWp16を得た。また、組換えBWp16のN末端アミノ酸配列解析の結果、pGEX-6P-1由来の5アミノ酸に続いて成熟BWp16のN末端アミノ酸配列が見られたことから、この組換え体発現系は適切に機能していることが示された。

(c)Western blot及びELISAによる組換えBWp16のそばアレルギー患者血清IgEとの反応性

そば抽出物のそばアレルギー患者血清17検体との反応性をWestern blottingにより検討した。そば抽出物(10 mg)あるいは組換えBWp16を4-20% SDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜(S&S)に転写した。転写膜は0.5% caseinでブロッキングし、そばアレルギー患者血清(希釈倍率1:4)あるいは対照血清(1:4)と室温、1時間、4 °C、18時間反応させた。PBS-Tで3回洗浄後、HRP-conjugated goat anti-human IgE (Fc) (1:500; Nordic Immunology)で室温、1.5時間反応させ、PBS-Tで3回洗浄を行なった。発色はKonica ImmunoStain HR P-1000 (Konica)で行なった。

患者血清17検体の検討の結果、13検体(76%)でそば抽出物の約16 kDaのバンドが検出された。そのうち、4検体が特に強い反応を示した。続いて、それら4検体の血清を用いて組換えBWp16のWestern blottingを行なったところ、全ての血清において16 kDaのバンドが強く検出された。また、患者血清と組換えBWp16をあらかじめ反応させてから、そば抽出物のWestern blottingを行なったところ、16 kDaのバンドのみが特異的に消失したことから、抽出物と組換え体のBWp16は免疫学的に同等であることが示された。

次に、組換えBWp16の上記4検体の血清との反応性をELISAにより検討した。96穴プレートに組換えBWp16を0.1 mg/wellの濃度で50 mM sodium carbonate buffer (pH 9.6)中で室温、2時間反応させ、抗原プレートを作製し、患者あるいは対照血清(1:100)を4 °C、一晚反応させた。翌日、HRP-conjugated goat anti-human IgE antibodies (1:1000)と反応させた。発色はTMB reagent (BD Biosciences)で行い、450-570 nmの吸光度で反応測定した。

ELISAの結果、上記4検体の血清は組換えBWp16と強い反応を示した。

(d) 組換えBWp16のin vitro pepsin分解性試験

そば抽出物あるいは組換えBWp16をpepsin溶液中で0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30及び60分間、37 °Cで反応させてSDS-PAGE後CBB染色により分解産物の検出を行なった。

この結果、そば抽出物のBWp16はpepsin反応10分後までに徐々に分解されていき、20分では完全に分解された。BWp16以外のタンパク質は0.5分後にほとんど分解されたことから、BWp16のみがpepsin分解に抵抗性を示す結果であった。組換えBWp16についてもpepsin反応10分後までに徐々に分解されていき、20分後には完全に分解された。分解産物としては6-7 kDaのバンドが0.5-20分の間で見られ、2.5-3.5 kDaのバンドが0.5-60分の間で見られた。これらの分解産物がアレルギー性を示すか否かは今後検討する。

(iii)人工胃液等による食品由来蛋白質の分解性に関する検討

(a) 多種のタンパク質による消化性試験

遺伝子組換え食品のアレルギー性研究の一環としての蛋白質のin vitro分解性試験の国際的validationを行うため、ILSI(the Allergy and Immunology Institute of the International Life Science Institute)主催の国際的validation試験(ring study)(米、欧、日の9機関が参加)に参画し、10種の基質タンパク質について、SGF(人工胃液(Simulated Gastric Fluid) (pH1.2とpH2.0の両方)による分解性の検討を行った。基質タンパク質としては、難分解性のピーナッツ抗原AraH2, 牛乳抗原 $\beta$ -lactoglobulin, Bovine serum albumin (BSA), 大豆抗原Soybean Trypsin Inhibitor, 卵白抗原Ovalbumin(OVA), Ovomucoid(OVM), なた豆レクチンConcanavalin A (Con A)、及び、易分解性の西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP), GM植物にも組みこまれているグリフォシネートアセチル化酵素(Phosphinothricin acetyltransferase, PAT), ほうれん草葉緑体中の炭酸同化反応に関与する酵素(ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RUBISCO)を用いた。SGFに用いるペプシンは、Sigma社製の酵素活性 3460 units/mg (カタログNo. 6887) のものを用い、基質蛋白質1 $\mu$ gに対し、ペ

プシンの酵素活性として、10（蛋白質濃度としては、およそ3ug）の比率になるように調整し、SGF溶液のpHは、2と2.0の両方を用いた。基質蛋白質とSGFの反応は、37°Cで行い、反応開始後、0、0.5、2、5、10、20、30、60分に反応を停止させ、基質蛋白質の分解の程度は、反応溶液をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行った後のクーマージブリアントブルー（CBB）蛋白染色にて確認を行った。食物アレルギーとして知られている蛋白質は、whole proteinあるいは、fragmentのいずれかの難分解性が、改めて確認された。また、SGFのpHとしては、2.0の方が、1.2よりも、分解に要する時間が幾分長いことが観察された。次に、米欧日9機関で得られたILSI主催のin vitro pepsin digestion assayの研究機関間のデータをまとめた結果を記す。OVM(分子量約42kDa)のSGFによる分解性をSDS-PAGEで確認する時、OVM蛋白のbandの位置がpepsinのbandの位置と重なるので、正確な分解時間を求めることができないため、9機関での解析結果をまとめる際には、OVMを除く9種の基質タンパク質の分解性を、完全長タンパク質及び断片の消失時間であらわした結果で示している。pH1.2及び2.0どちらの条件下でSGF分解性試験を行った場合も、各機関でよい合致率が得られた。特に完全長の消失時間についての各機関の解析結果では、かなりよい合致がみられ、pH1.2で、91%、pH2.0で、77%の数値が得られている。断片の消失時間については、幾分合致率がさがり、pH1.2で、80%、pH2.0で75%であった。基質タンパク質の分解に要する時間は、pH1.2、2.0どちらの条件でも大きな差はみられなかった。以上、in vitro SGF digestion実験のring studyの結果からは、pH1.2を用いる方が、標準的なin vitro SGF digestion試験として適していることが示された。

遺伝子組換え食品のアレルゲン性を評価する際には、挿入遺伝子産物のアレルゲン性および既知のアレルゲンとのアミノ酸配列の相同性、アレルギー患者血清中のIgEとの反応性などとともに、消化に対する抵抗性が重要な指標とされる。一定の実験条件を用いた人工胃腸液による各種蛋白質の基礎的な分解性データはこの観点からも必要不可欠なものと考えられた

#### (b) 消化性試験を行う際の前処理の影響について

食物アレルギーは、一般に経口摂取された蛋白質が消化管において酵素的分解を受けながら腸に到達し、その免疫系組織に捕捉され抗原として提示されることで成立すると言われる。従って、食物アレルギーの抗原性に消化されやすさが深く関与する。また食品を加工すると、分解性が変化して抗原性も変わると予想される。食物アレルギーとして知られる蛋白質、遺伝子組換え食品に新規に導入された蛋白質を含む、アレルギー性の認められていない蛋白質等を数種類選択し、人工胃液または腸液に対する分解性と、もっとも一般的な加工法として加熱の影響を同一消化条件下で比較したところ、加熱前処理(100°C、5分)により、消化性が上昇することを確認した。

(c) 消化抵抗性を示すアレルゲンで、どの程度までの分解断片が患者血清との反応性をもっているかについて

卵白中の主要なアレルゲンであるオボムコイド（OVM）の人工胃液による分解産物と患者血清との反応性を詳細に検討するために、5-30分の分解の経時変化に伴うアレルギー性の変化を検討した。その結果、分子量6千の断片まで患者血清との反応性を持っていることを確認した。

### ④-3 食物アレルギーのプロテミクス解析並びにアレルゲンデータベースの構築

#### 1) アレルゲン蛋白質とアレルギー患者血清との反応性に関する検討

##### i) Cry1Abの大腸菌による発現・精製および患者血清との反応性調査

遺伝子組換えトウモロコシBt11のゲノムのDNAから得られたCry1Ab遺伝子を用いて、一般的な条件で大腸菌に発現させるとインクルージョンボディになりやすく、水溶性のCry1Abを得るのは難しい。種々の条件を検討した結果、シャペロンを大量発現する大腸菌pTf16/BL21を宿主として用い、ベクターとしてpCold 1を選択した場合に水溶性Cry1Abの回収が良好となった。

このHisタグが結合したままの状態の水溶性 r Cry1Abを含むライセートおよびCry1Abを発現するGM-cornの抽出液を用いて、人工胃液（SGF）による分解性試験を行なった。すなわち、ライセートおよびGM-cornの抽出液を最終濃度0.32%のペプシンを含む塩酸溶液（pH1.2、含0.08 M NaCl, USP23 に準拠）に添加して37°Cでインキュベートし、経時的にサンプリングして、SDS-PAGEを行い、ニトロセルロース膜に転写して、マウス抗Cry1Abモノクローン抗

体を用いて検出した。

その結果いずれもCry1Abの半減期は30秒以内であり、アレルゲン性が強いオバルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリンなどと比較して、非常に分解されやすいことが判明した。 nativeなCry1Abと大腸菌由来のCry1Abで大きな差が見られなかったことから、消化抵抗性に関しては両者の性質は同等と考えられた。

次いで、r Cry1AbをELISA抗原として使用するため、精製を行なった。第一段階として、コバルトイオンを利用したキレートカラム (TALON CellThru, Clontech) で、Hisタグに対するアフィニティー精製を試みた。回収量は低いものの、他の蛋白質の混入が少なく、高い精製度が得られた。さらに第二段階としてゲル濾過カラムクロマトグラフィー (superdex 200 10/300 GL) を行い、SDS-PAGEでシングルバンドになるまで精製を進めた。

得られたHisタグ結合型の精製 r Cry1Abを0.2  $\mu$ g/wellで96wellプレートにコートし、アレルギー患者血清を1次抗体とするIgE-ELISAを行った。検体としては、2003および2004年度中に日本国内で採取された、食物アレルギー患者血清36人分 (アレルギー性疾患の臨床症状があって、病院にて治療をうけている患者で、何らかの食品に対する特異的IgEが陽性)、米国PlasmaLab社から購入したトウモロコシアレルギー患者血清8人分、および、健常者の血清10人分、計54人分の血清を用いた。コートしたプレートの各wellを0.1%casein-PBSでブロッキングし、0.1%casein-PBSで1/20に希釈した血清を1次抗体として4°Cで一晩反応させた後、昨年度報告したように1N-NaClを含有するPBS-0.02% Tween20 で洗浄を行い、2次抗体としてHRP-conjugated anti-human IgE(Fc) (1:1000、Nordic Immunology製) と反応させ、発色基質 (TMB reagent, BD Biosciences製) で検出した。健常者の平均値+5SDを超えたものを陽性と判定したところ、Cry1Ab特異的IgEが陽性の検体はなかった。発色が平均値+5SDに近い値を示した患者血清3検体については、確認のためELISA阻害実験を行った。血清希釈液に1 $\mu$ M Cry1Abを添加して4°Cで一晩反応させてから、同様なELISAを行ったが、やや高めな測定値が変化せず、これらの反応は非特異的なものであると考えられた。昨年度までも食品に導入されているCP4-EPSPS, PAT等で同様の血清テストを継続してきたが、これまでのところ陽性を示す検体は認められていない。

アレルゲン性の側面から遺伝子組換え食品の安全性を確認し、人々の理解を得るためには、こうしたデータの積み重ねが重要であると考えられる。アレルゲン性の *in vitro* 評価法として最も感度が高く、簡便なELISAを行うためには、精製蛋白質の入手が不可欠であり、実際にGM食品中に存在する新規蛋白質と同等の大腸菌由来蛋白質を調製する技術が求められる。

## ii) 組換え作物中の新規蛋白質を含む総蛋白質に対する患者血清の反応性調査

遺伝子導入を行ったことで、挿入された蛋白質だけでなくそれ以外の蛋白質が増減した可能性も考慮すべきである。トウモロコシ、大豆等は食物アレルギーの原因となることが知られている食品であり、既知のアレルゲンの増加がないことを確認しておく必要がある。そこで今年度は精製蛋白質のみでなく、従来のトウモロコシ (Non-GM-corn) と Cry1Ab を発現させたトウモロコシ (GM-corn)、あるいは従来の大豆 (Non-GM-soybean) と CP4-EPSPS を発現させた大豆 (GM-soybean) をそれぞれ抗原として患者血清による IgE-ウエスタンブロットを行なった。この実験からは、可食部に含まれる蛋白質全体に対する患者の IgE 反応性を、GM と Non-GM 間で比較することができる。

Non-GM-corn、GM-corn、Non-GM-soybean および GM-soybean のそれぞれの穀粒粉から、抽出した粗蛋白質 1mg 分を SDS-PAGE の 2D ゲル (幅 6 cm) に負荷し、ニトロセルロース膜にブロットした後、細片に切り離して患者血清と反応させた。さらに膜片を HRP-conjugated anti-human IgE(Fc) と反応させ、発色基質 (ImmunoStain, Konica) を用いて検出したところ、トウモロコシあるいは大豆のアレルギー患者の血清ではいくつかバンドが検出され、各々の患者にとっての抗原蛋白質が検出された。しかしながら、いずれも GM と Non-GM 間では差が見られなかった。

以上の結果、現在までのところ、GM 食品により、新たにアレルギーが引き起こされている可能性あるいは知られているアレルゲンとの交差反応は認められなかった。

## iii) ソバ 16kDa アレルゲンのエピトープマッピング

ソバアレルギーは頻度としては鶏卵等と比較して少ないが、加齢による寛解傾向が認められず、アナフィラキシーを含む重篤な症状を起こす危険性があるため、対策が求められる。抗原としてはこれ

までに患者頻度の高い24kDa アレルゲン (Fag e 1) の解析が進んでいるが、このほかにも8-50kDa の範囲にわたって10種類以上のアレルゲンが報告されている。このうち、16kDaのアレルゲンはアナフィラキシーの履歴のある患者血清中IgEと特異的に結合し、24kDaアレルゲンと比べて人工胃液中での分解性も悪いとの報告がある。16kDaアレルゲンについては最近大部分のアミノ酸配列が報告されたが、エピトープ等の情報は無い。そこで、この16kDaアレルゲンを精製し、解析を進めてspot法によるエピトープマッピングを試みた。まず、ソバの粗抽出液をSGF中でインキュベートし、消化分解性を検討したところ、16kDaアレルゲンは蛋白染色によって10分後まで残存していることが確認され、さらに患者血清によっても10分後まで認識されており、他の蛋白質と比較して分解されにくかった。16kDaアレルゲン認識する患者血清を用いてエピトープマッピングを行うため、報告された配列のoverlapping peptide (長さ12 AA, オフセット2AA) をセルロース膜上に合成し、IgE-ウエスタンブロットの要領で血清と反応させ、ケミルミネッセンス法で検出を行った。2名の患者でアミノ酸残基番号101-112前後の配列と弱く反応が見られたものの、有為であることが確認できず、エピトープであることが強く示唆される配列は検出されなかった。本法によってはエピトープ配列の特定に至らなかったが、mimotope法など他の手法も検討して、解析を進めていく予定である。

## 2) アレルゲンデータベース (Allergen Database for Food Safety; ADFS) の作成

ADFSではアレルゲンに関するデータはSDAP - Structural Database of Allergenic Proteins、List of Allergens in Swiss-Prot、Allergen Nomenclature、The Biotechnology Information for Food Safety Database等既存データベースより収集している。これらについてはweb公開後、個々の既存データベースがアップデートされたのに伴って、本データベースも新しい情報を取り込む作業を行った。ADFSの特徴であるIgEエピトープ配列情報は既存データベースのうちSDAPにのみ掲載されているが、既知エピトープ配列との相同性検索ツールを充実したものとするためにはさらにエピトープ情報を拡充する必要があった。情報源は1次資料(論文)を集めて抽出する方法しかないためEntrez PubMedによる論文の検索、収集、査読を行った。

ADFS公開当初のデータはSDAPのエピトープデータ(2002年アップデート分まで)を利用し、それ以後2004年3月までに発表された論文のみCTC-LSで収集・査読し、エピトープ配列情報を拾い出す作業を行なった結果得られたものである。論文収集は、下記に示す11のキーワードによりEntrez PubMed内を検索し、エピトープ情報を含む文献を抽出するという方法を用い、22報分のデータをADFSに収載した。

(IgE-Binding、Epitope、Identification、Immunoglobulin E、Epitope Mapping、Sequence、Analysis、Peptide、Recognition、IgE-epitopes、Linear)

その後、2度にわたり(2005年3月、2005年7月)、同様の方法で論文を検索し、合わせて15報分のデータを追加した。

今回さらに、立体的エピトープのマッピングデータの発表されているアレルゲンについてはADFSからそれらの論文へリンクできるようにする作業をおこなった。その過程で、配列型エピトープについてもかなり記載漏れが見つかり、立体的エピトープの論文と合わせて2002年以前の配列型エピトープデータについても収集・査読作業を行なった。立体的エピトープについては上記11のキーワードのうち1次配列を示す単語の代わりにconformational or structural or discontinuous or three-dimensionalを用いた。ヒットした論文のPubMed IDを取り出し、重複および記載済みの情報を差し引くと、138報の論文が抽出され、それらの要旨、本文等を査読した。

その結果、立体的エピトープの情報を取り込む論文17報、未収載の配列型エピトープ情報を追加する論文27報分のデータをADFSに収載することとし、アップデート作業を行った。現在、ADFSに収載されているアレルゲン数は1280であり、その内、配列型エピトープ情報の付加されているアレルゲン数は74である。

また、本年度、タンパク質のアレルゲン性予測機能については、FAO/WHO法としての改変Hileman法に加えて、さらに予測率の高いアレルゲン性予測手法としてStadlerら\*の motif-based prediction を利用できるようインターフェイスを開発した。motif-based法では、既知のアレルゲン配列からMEMEを用いてモチーフを抽出し、プロファイルを作成する。抽出さ

れたプロファイルに適合しないアレルゲンについてはシーケンスとして別に抽出する。そのプロファイルとシーケンスをもとに、未知アミノ酸配列に関してアレルゲン性を予測する方法である。Stadlerらの発表当時（2003年）には、52のモチーフと135のシーケンスが抽出されており、精度95.5%でクエリ蛋白質がアレルゲンであることを予測できるとされた。既知アレルゲンが追加されているため、この数は変動し、本研究では2005年9月で、67のモチーフと214のシーケンスが得られている。

以上の点を改良した、更新バージョンは2006年1月頃の公開予定を目指し、最終チェック作業中である。ADFSは既存データベースのうちで最大量のアレルゲンおよびエピトープ情報を搭載し、アレルゲン性予測機能を備えたユニークなデータベースとして、今後とも維持発展させるべく体制を整えている。

\*Stadlar MB and Stadlar BM, FASEB J. express article 10. 1096fj.02-1052fje. Published on line April 22, 2003

#### 4. 重点研究支援業務の状況

##### (1) 支援業務名「食物アレルギーのモデル実験系の確立」

- ①対応する重点研究課題の番号：①
- ②担当協力員名：佐藤 雄嗣
- ③支援業務の内容

Ovalbumin(OVA)を用いて経口感作に高感受性の動物モデルの検討を行ってきており、特にc-kit遺伝子に突然変異を持つW/W<sup>v</sup>マウス（マスト細胞欠損マウス）は他のマウス種に比べ非常に高い抗原特異的IgG1抗体価を示すことから、食物アレルギー動物モデルとして有用だと考えられた。また、W/W<sup>v</sup>マウスが経口感作動物モデルとして有用かどうかのさらなる確認をするため、OVA以外の他の食物抗原(Ovomucoid (OVM) 及びβ-lactoglobulin (β-lac))を用いて経口投与を行い、感作の程度について調べたところ、OVM投与群ではOVAやβ-lac投与群に見られたような大きな抗原特異的抗体価の上昇が見られなかったが、抗原-油脂 emulsionの経口投与により感作能の上昇がみられた。また、食品アレルギーのモデル系への各種食品成分の影響に関しては、経口でマウスに投与したCpG-oligodeoxynucleotides-OVA、リンゴポリフェノール、β-カロテンが、食物アレルギーモデルによるアレルギー反応をそれぞれ作用機作に違いはあるが、抑制をかけることが示された。

##### ④支援業務の成果（技術開発・高度化及び重点研究課題への寄与等）

本研究支援業務により確立されたオバルブミンを用いる経口感作モデルは、食物アレルギーの特殊性を解析するという重点研究課題への寄与を考える上で、重要かつ有意義なものである。さらに、オボムコイドの脂溶性をたかめた経口感作により高感受性マウスモデルを確立することが出来たが、この高感受性マウスの普遍性を検討するため、別のアレルゲン並びに非アレルゲンを用いて感作の成立を検討することが不可欠であり、他の研究機関との食物アレルギーモデルに関するバリデーションも必要である。さらに、食物アレルギーのメカニズムを解析するための薬物等による影響評価も着実に進められているが、応用にむけ、更なる詳細な検討が続けらる予定である。

(2) 支援業務名「遺伝子組換え手法を用いる新規蛋白質の大腸菌での大量発現並びにアレルギー性の検討」

- ①対応する重点研究課題の番号：①
- ②担当協力員名：児矢野 聡
- ③支援業務の内容

そば16-kDaアレルギーのcDNAを5'-及び3'-RACE PCR法でクローニングし、完全長cDNAを得た。ホモロジー検索の結果、そば16-kDaアレルギーは多くの植物のアレルギーとして同定されている2Sアルブミンファミリーに属することが示された。続いて、クローニングしたcDNAをpGEX-6P-1に連結し、GST融合そば16-kDaアレルギーを大腸菌で発現・精製した。精製した16-kDaアレルギータンパク質を用いてそばアレルギー患者血清との反応性をウエスタンブロット、ELISAアッセイにより確認した。また、ペプシンによるin vitro分解性試験を行なった。また、遺伝子組み換えトウモロコシの害虫抵抗性遺伝子であるCry1F及びCry3Bb1のcDNAクローニングを行なった。

- ④支援業務の成果(技術開発・高度化及び重点研究課題への寄与等)

そば16-kDaアレルギーは約7割のそばアレルギー患者血清と反応する主要そばアレルギーであることが示された。そば16-kDaアレルギーはペプシン分解に耐性であることが示され、消化過程で分解されにくいアレルギーとしての特徴を有していた。また、組換えそば16-kDaアレルギータンパク質はそばアレルギー患者の診断に用いることが示された。今後は立体構造エピトープの解析により、そばアレルギーの詳細な発症分子機構やワクチン開発研究をおこなっていく予定である。

(3) 支援業務名「食物アレルギーのプロテミクス解析並びにアレルギーデータベースの構築」

- ①対応する重点研究課題の番号：①
- ②担当協力員名：高木 加代子
- ③支援業務の内容

遺伝子組換え食品中の新規蛋白質と食物アレルギー患者血清の反応性について、検討を行った。トウモロコシに導入されたCry1Abは精製蛋白質が入手困難なため、大腸菌で調製したが、難溶性であったため、水溶性の状態での組換えCry1Ab作製を検討した。発現させた蛋白質を用いて、人工胃液に対する分解性試験を行うとともに、キレートカラムおよびゲル濾過カラムで精製し、ELISA抗原として用いた。今年度は精製蛋白質のみでなく、従来のトウモロコシ(Non-GM-corn)とCry1Abを発現させたトウモロコシ(GM-corn)に対する患者血清の反応性をそれぞれウエスタンブロット法で検出し、比較検討を行った。また、大豆についても従来の大豆(Non-GM-soybean)とCP4-EPSPSを発現させた大豆(GM-soybean)をそれぞれ抗原として患者血清によるIgE-ウエスタンブロットを行なった。その他、エピトープに関する知見を得るため、ソバ16kDaアレルギーのエピトープマッピングを試みた。

また、アレルギーデータベース(ADFS)を更に充実したものとするため、アレルギー情報の拡充・更新、エピトープ配列情報の追加、3次元エピトープ情報をもつ論文へのリンク、など新たな情報の追加を行なうとともに、タンパク質のアレルギー性予測機能については、FAO/WHO法としての改変Hileman法に加えて、Stadlerらのmotif-based predictionを利用できるようにした。

- ④支援業務の成果(技術開発・高度化及び重点研究課題への寄与等)

発現ベクターpCold-I DNAとシャペロン遺伝子が組み込まれた大腸菌pTf16/BL21を用いた場合に、水溶性蛋白として収率よく、Cry1Abを回収することができた。また、このrCry1Abは、人工胃液に対する分解性試験の結果、トウモロコシから抽出したCry1Abと同等の消化分解性を示した。さらにrCry1Abをコート抗原とするIgE-ELISAにより、国内の食物アレルギー患者36名分、米国のトウモロコシアレルギー患者血清8名分、および健常者血清10名分、計54検体の反応性を確認したところ、健常者群との比較により陽性を示したものはなかった。また、Non-GM-cornとGM-cornおよび従来の大豆(Non-GM-soybean)とCP4-EPSPSを発現させた大豆(GM-soybean)をそれぞれ抗原として患者血清によるIgE-ウエスタンブロットを行なった結果、GMとNon-GMの間で患者血清の反応性の差は認められなかった。

アナフィラキシー等重篤な症状を引き起こす可能性が示唆されているソバ 16kDa アレルゲンについて、spot 法によるエピトープマッピングを行ったが、エピトープ配列確認までには至らず、他の方法により、更に検討を行う予定である。

ADFS に関しては、アレルゲン情報およびエピトープ情報を更新するにあたり、個々の既知データベースのアップデートを反映させるとともにエピトープ情報を拡充する必要があった。情報源には SDAP の情報に加えて1次資料(論文)を用い、Entrez PubMed 内を検索し、エピトープ情報を含む文献を抽出するという方法で、当初 22 報分のデータを ADFS に収載していたが、その後 2 度にわたり(2005 年 3 月、2005 年 7 月)、同様の方法で論文を検索し、合わせて 15 報分のデータを追加した。今回さらに、立体的エピトープのマッピングデータの発表されているアレルゲンについては ADFS からそれらの論文へリンクできるようにする作業を行った。その過程で、配列型エピトープについても記載漏れが見つかり、2002 年以前の配列型エピトープデータについても収集・査読作業を行なった。最終的に、立体的エピトープの情報をリンクさせる論文 17 報、未収載の配列型エピトープ情報を追加する論文 27 報分のデータを ADFS に追加し、アップデート作業を行った。また、タンパク質のアレルゲン性予測機能については、FAO/WHO 法としての改変 Hileman 法に加えて、さらに予測率の高いアレルゲン性予測手法として Stadler らの motif-based prediction を利用できるようインターフェイスを開発した。

## 5. 発表論文等

(1) 原著論文 (著者名、論文タイトル、掲載雑誌名、巻・号・ページ、発行年)

1. Teshima R., Akiyama H., Okunuki H., Sakushima J., Goda Y., Onodera H., Sawada J. and Toyoda M.: Effect of GM and non-GM soybeans on the immune system of BN rats and B10A mice. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 41, 188-193 (2000)
2. Okunuki H., Teshima R., Sakushima J., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M. and Sawada J.: Induction of active systemic anaphylaxis by oral sensitization with ovalbumin in mast-cell-deficient mice. *Immuno. Lett.* 74, 233-237 (2000)
3. Akiyama H., Teshima R., Sakushima J., Okunuki H., Goda Y., Sawada J. and Toyoda M.: Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice. *Immunol.Lett.* 78, 1-5 (2001)
4. Matsuoka T., Kawashima Y., Akiyama H., Miura H., Goda Y., Kusakabe Y., Sebata T., Isshiki K., Toyoda M., and Hino A.: A method of detecting recombinant DNA from genetically modified maize. *J.Food Hyg.Soc.Japan* 41, 137-143 (2000)
5. Matsuoka T., Kuribara H., Akiyama H., Miura H., Goda Y., Kusakabe Y., Isshiki K., Toyoda M., and Hino A.: A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *J.Food Hyg.Soc.Japan* 42, 24-32 (2001)
6. Matsuoka T., Kuribara H., Suefuji Y., Miura H., Akiyama H., Kusakabe Y., Goda Y., Isshiki K., Toyoda M., and Hino A.: A detection method for recombinant DNA from genetically modified maize CBH351. *J.Food Hyg.Soc.Japan* 42, 197-201 (2001)
7. 手島玲子: 組換え食品の安全性とその評価. *農林水産技術研究ジャーナル*24(4) 34-39 (2001)
8. 手島玲子、生活環境中のアレルギー原因物質について、国立医薬品食品衛生研究所報告 119, 27-39 (2001)
9. Takagi K., Saito Y., and Sawada J.: Proteasomes are involved in the constitutive degradation of growth hormone receptors. *Biol. Pharm. Bull.*, 24 (7), 744-748 (2001)
10. Takagi K., Saito Y., and Sawada J.: Proteasome inhibitor enhances growth hormone-binding protein release. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 182, 157-163 (2001)
11. Okunuki H., Teshima R., Shigeta T., Sakushima J., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M. and Sawada J.: Increased digestibility of two products in genetically modified food (CP4-EPSPS and Cry1Ab) after preheating. *J.Food. Hyg.Soc. Japan* 43 (2), 68-73, (2002)
12. Nakamura R., Teshima R. and Sawada J.: Effect of dialkyl phthalates on the degranulation and Ca<sup>2+</sup> response of RBL-2H3 mast cells. *Immunol. Lett.*, 80, 119-125 (2002)
13. Teshima R., Watanabe T., Okunuki H., Isuzugawa K., Akiyama H., Onodera H., Imai T., Toyoda M. and Sawada J.: Effect of subchronic feeding of genetically modified corn (CBH351) on immune system in BN rats and B10A mice. *J.Food. Hyg.Soc. Japan*, 43 (5), 273-279 (2002)
14. Takagi K., Teshima R., Okunuki H. and Sawada J. : Comparative study of in vitro

- digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 969-973 (2003)
15. Okunuki H., Akiyama H., Teshima R., Hino A., Goda, Y. and Sawada J., Toyoda M. and Maitani T., Determination of Enzymatic Activity of 5-Enolpyruvyl shikimate-3- phosphate Synthase by LC/MS. *J. Food Hygienic. Soc. Japan*, 44, 77-82 (2003)
  16. Takagi K., Nakamura R., Teshima R. and Sawada J. Application of human FcεRIα-chain-transfected RBL-2H3 cells for estimation of active serum IgE. *Biol. Pharm. Bull.*, 26 (2), 252-255 (2003)
  17. Nakamura R., Ishida S., Ozawa S., Saito Y., Okunuki H., Teshima R. and Sawada J.: Gene expression profiling of Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitor DTBHQ and antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells. *Inflamm. Res.*, 51, 611-618 (2002)
  18. Sato Y., Teshima R., Nakamura R., Sasaki N., Morita Y., Sawada J. and Kitani S.: IgG-mediated signal transduction in canine mastocytoma-derived cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129, 305-313 (2002)
  19. Nakamura R., Sato Y., Takagi K., Sasaki N., Sawada J. Kitani S. and Teshima R.: Presence and primary sequence of a high-affinity IgG receptor on canine mastocytoma (CM-MC) cells. *Immunogenetics* 55, 271-274 (2003)
  20. Fujimoto T., Sato Y., Sasaki N., Teshima R., Hanaoka K. and Kitani S.: The canine mast cell activation via CRP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 212-217 (2003)
  21. Okunuki H, Teshima R, Harikai N, Sakai S, Akiyama H, Maitani T, Sawada J. Oral sensitization of W/W(v) mice with Ovalbumin and possible involvement of the decrease in gammadelta-T cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 26(9), 1260-1265 (2003)
  22. Sato Y., Teshima R., Nakamura R., Takagi K., Sasaki N., Sawada J. and Kitani S. Canine mast cell activation via human IgG1 and IgG4. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 135, 154-160 (2004)
  23. Onose J., Teshima R., Nakamura R. and Sawada J. Inhibition of degranulation from RBL-2H3 cells by casein-kinase II substrate peptide. *J. Health Sci.* 49(3), 243-247 (2003)
  24. Nakajima O., Hachisuka A., Okunuki H., Takagi K., Teshima R. and Sawada J. Method for delivering radiolabeled single-chain Fv antibody to the brain. *J. Health Sci.* 50(2), 159-163 (2004)
  25. Thomas, K., Teshima, R. et al, A Multi-Laboratory Evaluation of a Common *In Vitro* Pepsin Digestion Assay Protocol Used in Assessing the Safety of Novel Proteins. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.* 39(2), 87-98 (2004)
  26. Teshima, R., Nakamura R., Nakajima, O., Hachisuka A. and Sawada J. Effect of two nitrogenous diphenyl ether pesticides on mast cell activation. *Toxicol. Letter*, 150, 277-283 (2004)
  27. Shoji, T., Mustuga, M., Nakamura, T., Kanda, T., Akiyama, H., Goda, Y., Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chemistry*, 51, 3806-3813 (2003)
  28. Akiyama, H., Sakai, S., Linhardt, R.J., Goda, Y., Toida, T., Maitani, T., Chondroitin sulphate structure affects its immunological activities on murine splenocytes sensitized with ovalumin. *Biochem. J.*, 382, 269-78 (2004).
  29. Sato, Y., Akiyama, H., Suganuma, H., Watanabe, T., Nagaoka, M., Inakuma, T., Goda, Y., Maitani, T., The Feeding of β-Carotene Down-Regulates Serum IgE Levels and Inhibits the Type I Allergic Response in Mice. *Biol. Pharm Bull.*, in press.
  30. Nakamura, R., Okunuki, H., Ishida, S., Saito, Y., Teshima, R. and Sawada, J. Gene expression profiling of dexamethasone-treated RBL-2H3 cells: induction of anti-inflammatory molecules. *Immunol. Letter*, 98(2), 272-279 (2005)
  31. Okunuki H, Teshima R, Sato Y, Nakamura R, Akiyama H, Maitani T, Sawada J.  
The hyperresponsiveness of W/W(v) mice to oral sensitization is associated with a decrease in TCRgammadelta-T cells. *Biol Pharm Bull.* 28(4), 584-90 (2005)
  32. Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H., Ito, S., Kawasaki, N., Kawanishi, T., Hayakawa, T., Kohno, Y., Urisu, A., Sawada, J. Kinetic analysis of pepsin digestion of chicken egg White ovomucoid and allergenic potential of pepsin fragments: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 136, 23-32 (2005)
  33. Akiyama, H., Sakai, S., Linhardt, R.J., Goda, Y., Toida, T., Maitani, T., Chondroitin sulphate

- structure affects its immunological activities on murine splenocytes sensitized with ovalumin. *Biochem. J.* 382, 269-278 (2004)
34. Sato, Y., Akiyama, H., Suganuma, H., Watanabe, T., Nagaoka, M., Inakuma, T., Goda, Y., Maitani, T., The Feeding of  $\beta$ -Carotene Down-Regulates Serum IgE Levels and Inhibits the Type I Allergic Response in Mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 27(7), 978-984 (2004)
35. Akiyama, H., Amano, H., Bienenstock J. Rat Tracheal Epithelial Response to Water Avoidance Stress. *J. Allergy Clinical Immunology*, 116, 318-324 (2005)
36. Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H., Hachisuka, A., Sawada, J., Kojima, K., Takahashi, K., Ohsawa, M., Yoshida, T.: Survey of Food- and Airborne-Allergen-Specific IgE Levels in a General Population of 3-Year-Old Japanese Children: *Allergology International*, 55, 581-587 (2005)
37. Teshima, R., Okunuki, H., Sato, Y., Akiyama, H., Maitani, T., Sawada J. Effect of oral administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/W<sup>v</sup> mice. *Allergology International*, (in press)
38. 手島玲子、奥貫晴代、食物アレルギーの動物モデル アレルギーの臨床 319(7), 29-33 (2004)
39. 手島玲子、組換えDNA食品の安全性 食品衛生研究 54(6), 11-16 (2004)
40. 澤田純一、遺伝子組換え食品の安全性評価基準案について(総論) 食品衛生研究 54(10) 7-11 (2004)
41. 澤田純一、手島玲子、遺伝子組換え食品と食の安全 医学のあゆみ 211(8), 805-808 (2004)
42. Koyano, S., Takagi, K., Teshima, R., Sawada, J., Molecular cloning of cDNA, recombinant protein expression and characterization of a buckwheat 16-kDa major allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, (in press)
43. Takagi K., Teshima R., Sawada J., Determination of Human Linear IgE Epitopes of Japanese Cedar Allergen Cry j 1: *Biol. Pharm. Bull.*, 28(8) 1496-1499 (2005)
44. Takagi K., Teshima R., Nakajima O., Okunuki H., Sawada J., Improved ELISA method for screening human antigen-specific IgE and its application for monitoring specific IgE for novel proteins in genetically modified foods: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* In press (2005 Dec 16; [Epub ahead of print])
45. S. Sakai, H. Akiyama, N. Harikai, H. Toyoda, T. Toida, T. Maitani, T. Imanari, Effect of chondroitin sulfate on murine splenocytes sensitized with ovalbumin. *Immunol. Lett.*, 84, 211-216 (2002).
46. H. Akiyama, Y. Sato, T. Watanabe, M. Nagaoka, Y. Yoshioka, T. Shoji, T. Kanda, K. Yamada, M. Totsuka, R. Teshima., "Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models" *FEBS letters*, 579, 4485-4491 (2005).
47. Liu Y, Teshima R, Shirata N, Sugimoto Y, Ichikawa A, Tanaka S., Critical role of PKC $\beta$  II in activation of mast cells by monomeric IgE. *J Biol Chem.* 280, 38976 (2005)
48. Suzuki A., Suzuki R., Furuno T., Teshima R. and Nakanishi M Calcium response and Fc $\epsilon$ RI expression in bone marrow-derived mast cells co-cultured with SCG neurites. *Biol. Pharm. Bull.*, 28(10), 1963-1965 (2005)
49. Nakamura R., Teshima R. Takagi K. and Sawada, J. Development of allergen database for food safety (ADFS): as integrated database to search allergens and predict allergenicity. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.* (in press)
50. 手島玲子、長尾拓: バイオテクノロジー応用食品の安全性に関する基本的考え方、*応用薬理* 69, 43-46 (2005)

(2) 口頭発表(発表者名、口演タイトル、発表学会名(予稿集がある場合は予稿集名と掲載ページ) 開催年月日)

1. 奥貫晴代、手島玲子、重田輝子、佐久嶋順一郎、穂山浩、合田幸広、豊田正武、澤田純一: 遺伝子組換え食品導入蛋白質(CP4-EPSPS等)の熱感受性並びに *in vitro* 分解性試験. 日本食品衛生学会第81回学術講演会(2001.5)

2. 手島玲子: 遺伝子組換え食品のアレルゲン性試験. 第8回免疫毒性学会学術大会 (2001.9)
3. 高木加代子, 中村亮介, 渡邊敬浩, 手島玲子, 澤田純一: ヒト高親和性IgE受容体 $\alpha$ 鎖発現するRBL-2H3細胞のアレルギー患者血清による脱顆粒. 日本薬学会122年会(2002. 3)
4. 手島玲子, 高木加代子, 奥貫晴代, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 澤田純一: 食物アレルギー誘発性試験の一環としての *in vitro* 分解性試験, 第9回免疫毒性学会学術大会 (2002.9)
5. 手島玲子: 遺伝子組換え食品並びに食品のアレルギーのリスク評価について, 第39回全国衛生化学技術協議会(2002.10)
6. 手島玲子, 奥貫晴代, 澤田純一: W/Wvマウスの卵白アルブミン(OVA)経口投与によるASA誘導について, 第52回日本アレルギー学会総会 (2002.11)
7. 奥貫晴代, 手島玲子, 張替直輝, 酒井信夫, 穂山浩, 米谷民雄, 澤田純一: W/Wv マウスにおけるOVA 経口感作によるASA 誘導と $\gamma\delta$ -T 細胞の減少, 日本薬学会第123年会(2003.3)
8. 高木加代子, 奥貫晴代, 中村亮介, 手島玲子, 澤田純一: 食物抗原の人工胃腸液分解性に及ぼす加熱処理の影響, 日本薬学会第123年会 (2003.3)
9. 手島玲子, 渡邊敬浩, 奥貫晴代, 穂山浩, 今井俊夫, 澤田純一, 豊田正武: 遺伝子組換えとうもろこしCBH-351 のラット並びにマウスへの90日間混餌投与による免疫系への影響, 日本薬学会第123年会(2003.3)
10. Privalle L. et al.: A multi-laboratory evaluation of an *in vitro* pepsin digestion assay : variables affecting the reproducibility of a method for novel protein safety assessment, Amer. Acad. Allergy Asthma Immunol. 60th Anniversary , (2003.3)
11. 吉田貴彦, 松井利仁, 伊藤俊弘, 中木良彦, 大澤基保, 手島玲子, 小島幸一: 免疫指標による環境リスク評価の試みー3歳幼児での検証ー, 第73回日本衛生学会総会 (2003.3)
12. 酒井信夫, 高橋真弓, 穂山浩, 豊田英尚, 戸井田敏彦, 米谷民雄, 今成登志男「コンドロイチン硫酸糖鎖構造と免疫化学的活性の構造活性相関」日本薬学会第123年会 (長崎) (2003.3).
13. 穂山浩, 庄司俊彦, 佐藤雄嗣, 澤口貴仁, 酒井信夫, 渡邊敬浩, 神田智正, 合田幸広, 米谷民雄「リンゴ縮合型タンニンの全身性免疫系に及ぼす影響」日本薬学会第123年会 (長崎) (2003.3).
14. 佐藤雄嗣, 穂山浩, 渡邊敬浩, 長岡恵, 庄司俊彦, 神田智正, 合田幸広, 米谷民雄「リンゴプロシアニジン画分経口摂取のオボアルブミン経口感作に及ぼす影響」日本薬学会第124年会(大阪) (2004.3).
15. 穂山浩, 佐藤雄嗣, 菅沼大行, 渡邊敬浩, 長岡(浜野)恵, 稲熊隆博, 合田幸広, 米谷民雄「 $\beta$ -カロテン経口摂取による即時型アレルギー抑制作用」日本薬学会第124年会(大阪) (2004.3).
16. 手島玲子: 食物アレルギーの実験モデルとアレルゲン性評価, 第10回免疫毒性学会学術大会 (2003.9)
17. 金澤由基子, 新藤智子, 斎藤義明, 白見憲司, 小島幸一, 手島玲子: 経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル(1), 第10回免疫毒性学会学術大会 (2003.9)
18. 新藤智子, 金澤由基子, 斎藤義明, 白見憲司, 小島幸一, 手島玲子, 経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル(2), 第10回免疫毒性学会学術大会 (2003.9)
19. 手島玲子, 奥貫晴代, 澤田純一: W/WvマウスにおけるOVA経口感作によるASA誘導と $\gamma\delta$ -T細胞について, 第53回日本アレルギー学会総会 (2003.11)
20. 高木加代子, 奥貫晴代, 手島玲子, 澤田純一: 組換え食品中の新規蛋白質と患者血清の反応性評価法に関する研究, 日本薬学会第124年会 (2004.3)
21. 奥貫晴代, 手島玲子, 佐藤雄嗣, 澤田純一: W/Wv マウスにおけるCpG oligodeoxynucleotide OVA経口感作による影響, 日本薬学会第124年会 (2004.3)
22. 高木加代子, 手島玲子, 奥貫晴代, 伊藤さつき, 川崎ナナ, 川西徹, 早川堯夫, 澤田純一: Digestive stability and allergenic potential of chicken egg white ovomucoid and their pepsin-fragment, 第76回日本生化学会大会 (2003.10)
23. 奥貫晴代, 手島玲子, 佐藤雄嗣, 穂山浩, 米谷民雄, 澤田純一: Oral sensitization of W/Wv mice with ovalbumin and possible involvement of the decrease in TCR $\gamma\delta$ -T cells, 第76回日本生化学会大会 (2003.10)
24. 手島玲子: 食の安全性に関するシンポジウム part 1ー「遺伝子組換え食品とアレルギー」, お茶の水

女子大学生生活環境センター (2003.12)

25. 手島玲子:組換え DNA 食品の安全性、日本食品衛生協会シンポジウム—食品の安全研究をめぐって— (2004.1)
26. Esdaile D.J. et al.: A multi-laboratory evaluation of a Common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins, 41<sup>st</sup> congress of the European Societies of Toxicology , (2003.9)
27. 手島玲子: 人工胃液によるタンパク質の消化性—ILSI-HESI リングスタディーの結果—、ILSI HESI/ILSI Japan タンパク質のアレルギー誘発性に関するワークショップ (2003.9)
28. Takagi K., Teshima, R., Sawada, J., 「Epitope analysis of Japanese cedar pollen allergen Cry j 1」第77回 日本生化学会大会, (2004.10)
29. 高木加代子, 手島玲子, 奥貫晴代, 蜂須賀暁子, 澤田純一, 大沢基保, 吉田貴彦 「3歳児血清中 TARC 濃度とアレルギー性疾患の関連性に関する検討」日本薬学会 125 年会 (2005.3)
30. 奥貫晴代、手島玲子、佐藤雄嗣、澤田純一 「W/W<sup>v</sup>マウスにおける CpG Oligodeoxynucleotides-OVA 経口感作による影響」日本薬学会第124年会 (2004.3)
31. 奥貫晴代、手島玲子、佐藤雄嗣、穠山浩、米谷民雄、澤田純一 「The Effect of reconstitution with bone marrow cells on oral sensitization of W/W<sup>v</sup> mice with ovalbumin」第77回日本生化学会大会 (2004.10)
32. 奥貫晴代、手島玲子、佐藤雄嗣、穠山浩、米谷民雄、澤田純一 「BALB/cマウスにおける CpG-ODN-OVA経鼻投与の効果」日本薬学会第125年会 (2005.3)
33. 穠山浩、佐藤雄嗣、渡邊敬浩、長岡恵、吉岡靖雄、庄司俊彦、神田智正、山田潔、戸塚護、手島玲子、合田幸広、澤田純一、米谷民雄「ベータカロテン混餌投与による I 型アレルギー抑制作用について」第10回日本食品化学学会総会(大阪)(2004.6)
34. 佐藤雄嗣、穠山浩、渡邊敬浩、長岡恵、庄司俊彦、神田智正、合田幸広、米谷民雄「リンゴプロシアニジン画分経口摂取のオボアルブミン経口感作に及ぼす影響」第35回日本免疫学会総会(札幌)(2004.12)
35. 佐藤雄嗣、穠山浩、赤羽根望美、長岡恵、吉岡靖雄、手島玲子、澤田純一、米谷民雄、滝田聖親、菅沼大行、稲熊隆博、「抗原経口感作誘導マウスにおけるカロテン経口摂取の食物アレルギー抑制作用」日本薬学会第125年会(東京)(2005.3)
36. 金澤由基子、新藤智子、斎藤義明、白見憲司、小島幸一、手島玲子「経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル(3)」第11回免疫毒性学会学術大会 (2004.9)
37. 手島玲子、高木加代子、奥貫晴代、中村亮介、蜂須賀暁子、澤田純一、小島幸一、大沢基保、吉田貴彦「3才児の食物並びに吸入アレルゲン特異的 IgE 抗体の実態調査」第11回免疫毒性学会学術大会 (2004.9)
38. 手島玲子、奥貫晴代、澤田純一 「W/W<sup>v</sup>マウスにおける CpG ODN-OVA経口感作による影響について」第54回日本アレルギー学会総会 (2004.11)
39. Teshima R. 「In vitro digestive stability evaluation」10th International Congress of Toxicology (2004.7)
40. Teshima R 「Improvement of ELISA method for antigen-specific IgE in human sera」ILSI HESI International Bioinformatics Workshop (2005.2)
41. 朝川 直行、手島 玲子、美宅 成樹「アレルゲンタンパク質予測に向けたアミノ酸配列断片の組み合わせ解析」第42回生物物理学会 (2004.12)
42. 児矢野聡、高木加代子、手島玲子、澤田純一「そば16-kDaアレルゲンの組換えタンパク質の調製及びアレルギー患者血清との反応性について」日本薬学会第126年会 (2006.3)
43. 高木加代子、手島玲子、奥貫晴代、蜂須賀暁子、澤田純一、大沢基保、吉田貴彦：一般小児血清中の免疫指標調査—IgE、TARCおよびIP-10濃度について—、日本アレルギー学会第55回秋季学術大会(2005,10)
44. 穠山浩、佐藤雄嗣、渡邊敬浩、長岡恵、吉岡靖雄、庄司俊彦、神田智正、山田潔、戸塚護、合田幸広、米谷民雄「食物アレルギー経口感作におけるリンゴプロシアニジン抑制効果」日本免疫学会(札幌)(2004.12).
45. 佐藤雄嗣、穠山浩、赤羽根望美、長岡恵、吉岡靖雄、滝田聖親、菅沼大行、稲熊隆博、手島玲子、澤田純一、米谷民雄、「抗原経口感作誘導マウスにおけるカロテン経口摂取の食物アレルギー抑制作用」日本薬学会第125年会(東京)(2005.3).
46. 穠山浩、佐藤雄嗣、渡邊敬浩、長岡恵、吉岡靖雄、庄司俊彦、神田智正、山田潔、戸塚護、手島玲子、合田幸広、澤田純一、米谷民雄「プロシアニジンの食物アレルギー発症抑制作用につ

いて」食品化学学会（東京）（2005.4）.

47. 穠山浩、佐藤雄嗣、渡邊敬浩、長岡恵、吉岡靖雄、庄司俊彦、神田智正、山田潔、戸塚護、手島玲子、合田幸広、澤田純一、米谷民雄「Apple condensed tannin inhibits the development of food allergies in mouse models」日本免疫学会（横浜）（2005.12）.

48. 手島玲子、奥貫晴代、中村亮介、穠山 浩、米谷民雄、澤田純一：W/W<sup>v</sup> マウスの卵白アルブミン（OVA）経口投与による ASA 誘導ならびにPAFの作用について、第6回 Pharmacologyシンポジウム（2005.7）

49. 手島玲子、中村亮介、澤田純一：マスト細胞からのケモカイン遊離並びにバイオマーカーの探索、第12回免疫毒性学会（2005.9）

50. 中村 亮介、手島玲子、高木加代子、澤田純一：食物アレルギーの予測とバイオインフォマティクスアレルギーデータベースの構築と利用一、第 12 回免疫毒性学会（2005.9）

51. 手島玲子、長尾拓：バイオテクノロジー応用食品の安全性に関する基本的考え方、第 8 回食品薬学シンポジウム（2005.11）

52. 手島玲子：遺伝子組換え食品の活用とその問題点—これからの展望—、第9回日本病態栄養学会年次学術集会（2006.1）

（3）特許（発明者、発明の名称、特許番号、特許の種類、出願公開・公告の日付）

1. 「免疫調節剤」特願平 10-244578 出願日 2003 年 9 月 5 日

2. 「免疫制御剤」特願 2003-244578 出願日 2003 年 9 月 4 日

3. 「植物由来プロアントシアニジン類を有効成分として含むことを特徴とする食物アレルギー予防剤」特願 2004-283596 出願日 2004 年 9 月 29 日

(別紙)

## 支援開始当初の計画と対比した5年間の評価等

### 1. 支援開始当初の計画と対比した5年間の研究成果

食物アレルギーの克服と予防のため、(i)動物を用いた食物アレルギーのモデル系の確立と生体の反応機構の解明、(ii)遺伝子組換え手法を用いる新規タンパク質の大腸菌での大量発現並びにアレルゲン性の検討、(iii)食物アレルギー患者血清中抗原特異的IgE抗体測定系の検討、並びにアレルゲンデータベースの作成を3つの目標として研究を行ってきた。5年間のうちに、食物アレルゲンの経口感作による免疫をマウスで成立させることのできるモデルの開発、3種の新規タンパク質につき、大腸菌での大量発現に成功し、アレルギー患者血清との反応性を検討が終了し、配列検索機能も備えた国立衛研独自のアレルゲンデータベース(ADFS)を立ち上げることができた。ほぼ当初の予定を達成できたと考える。

### 2. 重点研究課題に対する支援協力員の貢献度

大腸菌で発現した新規産生タンパク質とヒト血清との反応条件の確立を行い、国外への論文発表並びに国際学会での発表を行なった。(ii)当所で開発したアレルゲンデータベースは、エピトープ情報を、世界的にも最も多く収載しており、そのエピトープ情報の収集を、支援研究員が中心で行なった。(iii)動物モデルの開発では、従来、マウスでは、経口感作による食物アレルギーモデルの開発は難しいとされていたが、マウスの系統の選択や、感作方法の改良により、経口感作による免疫を成立させることが可能となった。等、支援協力員の貢献度は多大であった。

### 3. 重点研究支援が研究所全体に及ぼした影響

食物アレルギーの克服と予防にむけた研究課題は、研究所の重要テーマである食の安全に直結するテーマであり、本重点研究支援により得られた成果は、今後の遺伝子組換え食品の安全性研究、食物アレルゲンの表示、食物アレルギーの低減化につながる研究である。従って、重点研究支援が研究所全体に及ぼした影響は多大であると考えられる。

### 4. 研究代表者の総合的自己評価

本研究課題は、食物アレルギー発症及びその調節メカニズムの解明を行う基礎研究と、組換え食品の安全性評価への応用を行うという応用研究の両面を持った研究であったが、食物アレルゲンの動物モデルの開発、新規産生タンパク質やアレルゲンの大腸菌での大量発現という基礎研究から、組換え食品の安全性研究のうちのアレルゲン性試験に用いることのできる消化性試験の標準化、アレルギーデータベースの作成など、応用面においても、十分な成果が得られたと思われる。

### 5. 研究所全体における評価

本研究は、研究所の重要テーマである食の安全に直結する食物アレルギーの克服と予防にむけたテーマであり、今後の遺伝子組換え食品の安全性研究、食物アレルゲンの表示、食物アレルギーの低減化につながる研究で、研究所全体における評価は高い。

### 6. 支援業務の今後の展開(見込み)

今後も、食物アレルゲンの予防並びに低減化をめざした研究のため、特に、アレルゲンのエピトープ解析等、分子生物学的手法の積極的な導入により推し進めてゆく予定である。また、アレルゲンデータベースのアップデート並びに整備を積極的に進める予定である。